



**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

**CONTRIBUCIÓN DE RNAs NO CODIFICANTES  
PEQUEÑOS DEL HOSPEDADOR Y DEL VIRUS A  
LA PATOLOGÍA PULMONAR INFLAMATORIA  
CAUSADA POR EL CORONAVIRUS DEL  
SÍNDROME RESPIRATORIO AGUDO Y GRAVE**

**TESIS DOCTORAL**

**MARÍA LUCÍA MORALES RODRÍGUEZ**

**MADRID, MAYO 2017**





**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

**CONTRIBUCIÓN DE RNAs NO CODIFICANTES  
PEQUEÑOS DEL HOSPEDADOR Y DEL VIRUS A  
LA PATOLOGÍA PULMONAR INFLAMATORIA  
CAUSADA POR EL CORONAVIRUS DEL  
SÍNDROME RESPIRATORIO AGUDO Y GRAVE**

**Memoria presentada por la Licenciada en Bioquímica D<sup>a</sup> María Lucía Morales Rodríguez, adscrita al Departamento de Biología Molecular, para optar al grado de Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid.**

**El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido realizado en el Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) bajo la codirección de los Drs. Isabel Sola Gurpegui y Luis Enjuanes Sánchez.**







**El trabajo que se describe en esta memoria ha sido realizado en el Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) bajo la codirección de los Drs. Luis Enjuanes e Isabel Sola.**

**Madrid, Mayo de 2017**

**Fdo. Luis Enjuanes Sánchez**

**Fdo. Isabel Sola Gurpegui**



## **AGRADECIMIENTOS**

El trabajo, esfuerzo y dedicación de muchas personas ha dado como resultado esta tesis. Cada una de estas personas han aportado su granito desde distintas perspectivas y quiero agradecerles profundamente su apoyo, confianza y cariño.

Esta travesía comenzó cuando el profesor de investigación Luis Enjuanes apostó por una joven becaria a la que brindó la oportunidad de realizar la tesis doctoral. Desde entonces he disfrutado de un ambiente enriquecedor en el que formarme científica y profesionalmente, por lo que te doy las gracias de corazón, Luis. En este tiempo me has enseñado que en ciencia como en la vida hay que trabajar duramente para alcanzar nuestros objetivos y que, además, hay que saber transmitir y valorar lo que hacemos. Isabel, sin duda esta memoria y yo misma nos hemos forjado bajo tu dirección. Admiro tu buen hacer, tu plena disposición y tu carácter siempre amable. Te agradezco francamente la confianza que has depositado en mí y que me ha permitido desarrollar este proyecto en equilibrio entre tu sostén y mi independencia.

Gracias a todos mis compañeros del laboratorio 114: los que me han acompañado todos estos años, los que me acompañaron y se marcharon, y los que han llegado después. Gracias Sonia, es un gusto trabajar junto a ti, siempre tienes la respuesta y siempre la ofreces con una sonrisa. Gracias Marga, por ayudarme cada vez que te lo he pedido, tu sabiduría y diligencia son infinitas. A Carlos, gracias por no dejar de sorprenderme, tu buen rollo y tus ganas de pasarlo en grande, siempre a todo volumen. A Raúl, gracias por ser tan buen tío, es un verdadero placer contar contigo dentro y fuera del trabajo, puedes estar seguro de que esta tesis es también tuya. Gracias Pedro, con especial cariño recuerdo mi primer año siempre juntos en el laboratorio, y cómo me acogiste bajo tu ala para enseñarme las bases que he usado desde entonces. Martina, recorrer juntas este camino ha sido una gran suerte, ganando en información clasificada pero sobretudo en alegría. Gracias por ser tan atenta, directa y luchadora, has sido un ejemplo a seguir. Gracias a todos los Joses de la zona A, el bondadoso José Luis, el vividor José Manuel y el bromista José Ángel. Charly, tu optimismo contagioso, tu vitalidad y valentía te hacen único. Gracias por las risas, enseñarme lo que puede dar de sí el tiempo y por ampliar los límites de mi mente. Alejandro, gracias por hacer llevaderas las cosas, tu apoyo continuo y tu alma justiciera. Javier, gracias por mostrarme que existe el compañero perfecto, eres impresionante en todas tus facetas, ten la seguridad de que todo llegará. Jose, gracias por tus gestos de cariño y admiración, y por tus historias, que cuentas de esa forma tan tuya con la que nos hemos reído tanto.

Muchísimas gracias a toda la primera planta. En todo este tiempo me he cruzado con mucha gente por los pasillos, en cultivos, peleándonos por las centrífugas y ha

sido genial. Entre todos me encumbrasteis como ganadora del concurso de póster del CNB y vuestro apoyo me emocionó. Sin olvidar lo bien que lo hemos pasado en las memorables cenas de departamento, cuando jugamos la final de fútbol femenino o en las celebraciones de congresos, artículos, cumpleaños y conciertos. Gracias a Carlos, Giselle, Eli, Xose, Paz, Gema, Ginés, Laura, Ale, Ana, Diego por todos los pequeños momentos de todos los días. Silvia, admiro tu fuerza y autenticidad, y te agradezco que siempre hayas estado a mi lado para hablar, salir y reír. Sara, la primera no ha sido igual sin tu alegría y complicidad. Lidia, siempre dispuesta, bien para una larga charla o una noche loca. Lili, eres un gustazo de vecina: atenta, cariñosa y sonriente; ánimo que ya está superado. Noe, enseguida te hiciste de querer, cómo nos hemos reído en el teatro, el monte y la pista de baile. Victoria, optimista y trabajadora, qué reconfortantes son las mini-charlas contigo. Noe, tu buen humor nos ha hecho pasar muchos buenos momentos en cultivos. Lázaro, el filósofo, me ha encantado escuchar tu proverbio de cada día en las comidas. Iborra, qué lujo de científico y de persona. Fernando, nos hemos reído mucho todos estos años, gracias por tus sabios consejos.

Además, esta tesis no hubiera sido posible y, por supuesto, no hubiera sido tan llevadera sin la participación de mucha gente del CNB que son grandes profesionales y personas estupendas. Muchas gracias a BioinfoGP, en especial a Juan Carlos. Tu extrema meticulosidad en combinación con tu simpatía han hecho que nuestras muchas reuniones despertaran mi interés en la bioinformática, algo que nunca hubiera imaginado. Gracias a Bioseguridad, vuestra disposición nos facilita enormemente el trabajo diario. Gracias a Histología, Soledad y Óscar, por poner siempre de vuestra parte. Gracias a Confocal, Silvia y Ana, por vuestros consejos e interés. Gracias a Almacén, Juan Carlos y Antonio, porque bajar a comprar era un buen rato asegurado. Gracias a Animalario, el cuidado de los ratones se refleja en nuestros resultados. Y, en general, muchas gracias a todos los que silenciosamente movéis este centro: cocina, instrumentación, mantenimiento, viajes, compras, servicios generales, divulgación, biblioteca, recepción, seguridad, limpieza y todos los que se me olvidan.

Y ya que ésta va ser la parte que se lean mis amigos y que van a entender, os quiero dedicar unas palabras de gratitud y de amor. Son ya muchos años los que llevamos juntos y mucho lo que hemos compartido, algunas cosas más duras y muchas otras divertidas. Deciros que estoy muy orgullosa de las personas que sois hoy y feliz de haber pasado mi juventud con vosotros. Aunque no siempre comprendáis muy bien qué hago, siempre me habéis arropado, cada uno a su manera, y me habéis recordado el sentido de ser científico: responder a todas las preguntas que se les pase por la cabeza a tus amigos sean del tema que sean. De verdad, muchas gracias a todos, se os quiere y se os venera: Peke, Blas, Ceci, Raúl, Alberto,

Diego, Cuervo, Santi, Pablo, Jaime, Clarita, Pucha, Mery, Jorge, Labor, Gsule, Tamara, David, Anita, Javivi, Joako, Takel, Ichi, Mure, Irene, Soni, Ñus ...

Muy especialmente quiero compartir esta tesis con toda mi familia y agradeceros vuestro empuje y cariño desde que tengo recuerdos y hasta el día de doctorarme. Los valores que me habéis transmitido han sido imprescindibles para alcanzar esta meta: superación, alegría, compromiso, bondad. Me siento muy afortunada de teneros siempre a mi lado y sé que esta celebración será de todos y la recordaremos por mucho tiempo. Mamá y papá, muchas gracias porque en casa he disfrutado de vuestro apoyo incondicional, generosidad infinita y también paciencia. Marcos, gracias por ser un auténtico hermano, por tu honestidad y ser ejemplo de esfuerzo y valentía. Abuelitos, gracias por luchar tanto y hacerlo con tanta alegría. Tíos, gracias por las largas charlas, los ratos en la naturaleza y las barbacoas. Primos, gracias por las risas, confidencias y buenísimos ratos juntos. Suegros, gracias por hacerme sentir como a vuestra hija. Cuñaos, gracias por hacerme llegar vuestro cariño, incluso desde cierta distancia prudencial de seguridad.

Para terminar, me dejo lo mejor. Guillermo, me da vértigo pensar en todo lo que hemos pasado juntos, me emociona que seas mi amigo, mi familia, mi amor. Quiero agradecerle que me haga mejorar cada día, que me saques una sonrisa cuando parece imposible y que me demuestres tu amor sin descanso. Esta tesis es sin duda tuya porque aunque no entiendas lo que pone y aunque no la vayas a leer, tu la has vivido junto a mí todos estos años, celebrando las alegrías y aupando las penas. Muchas, muchas gracias.



## ÍNDICE

---





I. <b>ÍNDICE</b> .....	1
II. <b>ABREVIATURAS</b> .....	9
III. <b>SUMMARY</b> .....	15
IV. <b>RESUMEN</b> .....	17
V. <b>INTRODUCCIÓN</b> .....	19
1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS CORONAVIRUS.....	19
1.1. Clasificación taxonómica.....	19
1.2. Epidemiología.....	19
1.3. Estructura del virión.....	21
1.4. Estructura del genoma y expresión génica.....	22
1.5. Ciclo infectivo.....	24
2. EL SÍNDROME RESPIRATORIO AGUDO Y GRAVE.....	26
2.1. Patología pulmonar causada por el SARS-CoV .....	26
2.2. Bases moleculares de la patología .....	27
2.3. Modelos animales.....	28
2.4. Relevancia de la proteína E en la virulencia del SARS-CoV.....	29
2.5. Terapias frente a SARS-CoV.....	30
3. RNAs NO CODIFICANTES.....	31
3.1. RNAs no codificantes celulares. Tipos, origen y función.....	31
3.2. miRNAs.....	33
3.2.1. Biogénesis de los miRNAs.....	33
3.2.2. Mecanismo de acción de miRNAs.....	35
3.2.3. Funciones de los miRNAs.....	36
3.2.4. Identificación de dianas de miRNAs.....	38
3.3. RNAs no codificantes virales.....	39
3.3.1. Expresión de ncRNAs en virus de genoma DNA.....	39
3.3.2. Expresión de ncRNAs en virus de genoma RNA.....	40
VI. <b>OBJETIVOS</b> .....	43
VII. <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	45
1. CÉLULAS EUCARIOTAS.....	45
1.1. Líneas celulares.....	45
1.2. Cultivo de líneas celulares eucariotas.....	45
2. VIRUS.....	45
2.1. Aislados virales.....	45
2.2. Crecimiento y titulación de virus en cultivos celulares.....	46
3. BACTERIAS.....	46
3.1. Cepas y cultivos de bacterias.....	46
3.2. Generación de bacterias competentes.....	47
3.3. Transformación de bacterias.....	47
4. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DEL DNA.....	47
4.1. Manipulación y purificación de plásmidos.....	47
4.2. Enzimas de restricción y modificación del DNA.....	48

4.3. Amplificación del DNA mediante PCR.....	48
4.4. Electroforesis del DNA en geles de agarosa.....	48
5. INFECCIÓN DE RATONES CON SARS-CoV.....	49
5.1. Declaración ética.....	49
5.2. Cepas de ratón.....	49
5.3. Inoculación y seguimiento de la enfermedad.....	49
5.4. Extracción de sangre.....	50
5.5. Aislamiento de virus de pulmones.....	50
5.6. Extracción de RNA de pulmones y suero.....	49
5.7. Histopatología.....	51
5.8. Inmunohistoquímica.....	51
6. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DEL RNA.....	52
6.1. Análisis del RNA extraído de pulmones.....	52
6.2. Secuenciación masiva.....	52
6.3. Generación de cDNAs mediante RT-PCR.....	53
6.4. Cuantificación de RNAs mediante RT-PCR cuantitativa.....	53
6.5. Electroforesis y detección de RNA por sondas ( <i>northern blot</i> ).....	55
6.6. Microscopía por hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia (FISH).....	55
7. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LOS RESULTADOS DE SECUENCIACIÓN MASIVA DE RNAs PEQUEÑOS Y GRANDES.....	57
7.1. Filtrado, alineación y procesamiento de las secuencias de RNAs pequeños.....	57
7.2. Identificación y caracterización de RNAs pequeños.....	57
7.3. Búsqueda de dianas de RNAs pequeños.....	58
7.4. Filtrado, alineación y procesamiento de las secuencias de RNAs grandes.....	58
7.5. Expresión diferencial de los caracteres genómicos.....	59
8. CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS.....	59
8.1. Construcción de plásmidos.....	59
8.2. Construcción de plásmidos para estudiar el procesamiento de svRNAs por enzimas celulares.....	60
8.3. Construcción de plásmidos para estudiar el silenciamiento de la expresión de un mRNA diana por svRNAs.....	61
9. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS.....	61
9.1. Transfección reversa de inhibidores de svRNAs.....	61
9.2. Transfección reversa de plásmidos.....	62
10. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.....	63
10.1. Inmunodetección de proteínas ( <i>western blot</i> ).....	63
10.2. Inmunomicroscopía de fluorescencia indirecta (inmunofluorescencia).....	63
11. ENSAYO DE ACTIVIDAD LUCIFERASA.....	64
12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	65
VIII. RESULTADOS.....	67
1. ANÁLISIS POR SECUENCIACIÓN MASIVA DE RNAs PEQUEÑOS NO CODIFICANTES EN LA INFECCIÓN DE RATONES POR SARS-CoV.....	67
1.1. Infección <i>in vivo</i> y preparación de las muestras para secuenciación.....	67

masiva.....	
1.2. Secuenciación masiva de los RNAs de pulmones infectados por SARS-CoV.....	71
1.3. Alineamiento de las secuencias de RNAs pequeños con genomas de referencia.....	73
1.3.1. Definición de <i>loci</i> o posiciones de alineamiento de RNAs pequeños en el genoma de ratón.....	74
1.3.2. Visualización de los alineamientos de RNAs pequeños con el genoma.....	75
2. EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE RNAs PEQUEÑOS DE RATÓN (miRNAs) EN PULMONES DE RATONES INFECTADOS CON EL VIRUS SARS-CoV VIRULENTO O ATENUADO.....	76
2.1. Parámetros que definen la expresión diferencial de RNAs pequeños.....	76
2.2. Búsqueda de miRNAs diferencialmente expresados anotados en bases de datos.....	78
2.3. Búsqueda de potenciales mRNAs diana para los miRNAs diferencialmente expresados.....	80
2.4. Función de los potenciales mRNAs diana de los miRNAs diferencialmente expresados.....	81
2.5. Estudio comparativo de la expresión diferencial de miRNAs y RNAs largos en los pulmones de ratones infectados por SARS-CoV.....	82
3. IDENTIFICACIÓN DE RNAs PEQUEÑOS DERIVADOS DEL GENOMA DE SARS-CoV.....	87
3.1. Identificación de secuencias de RNAs pequeños no codificantes derivados del genoma de SARS-CoV en pulmones de ratón.....	87
3.2. Detección de svRNAs derivados del SARS-CoV en cultivos celulares.....	91
3.3. Inhibición de los svRNAs en células infectadas con el SARS-CoV con oligos específicos antisentido.....	93
4. ESTUDIO DE LA BIOGÉNESIS DE LOS svRNAs DERIVADOS DEL SARS-CoV.....	96
4.1. Procesamiento de los svRNAs por la maquinaria celular.....	96
4.2. Relevancia de las enzimas celulares de procesamiento de miRNAs, Drosha y Dicer, en la biogénesis de svRNAs.....	100
5. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE LOS svRNAs DERIVADOS DE SARS-CoV EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE mRNAs CELULARES.....	101
5.1. Silenciamiento de la expresión de proteínas marcadoras por los svRNAs.....	101
5.2. Efecto esponja de los svRNAs sobre miRNAs celulares.....	104
5.3. Localización del svRNA-N en células infectadas con el SARS-CoV.....	107
6. RELEVANCIA FUNCIONAL DEL svRNA-N EN LA INFECCIÓN DE RATONES CON SARS-CoV.....	109
6.1. Inhibición con oligonucleótidos antisentido del svRNA-N en ratones infectados con SARS-CoV.....	109
6.2. Efecto de la inhibición del svRNA-N en el crecimiento del virus en ratones infectados con SARS-CoV.....	111
6.3. Efecto de la inhibición del svRNA-N en la patología causada por SARS-CoV en ratones.....	111
7. BÚSQUEDA <i>IN SILICO</i> DE DIANAS POTENCIALES PARA LOS RNAs PEQUEÑOS DERIVADOS DE SARS-CoV.....	117

8. MECANISMO DE ACCIÓN POSTULADO PARA EL FUNCIONAMIENTO DE RNAs PEQUEÑOS NO CODIFICANTES EN LA INFECCIÓN DE PULMONES DE RATÓN POR SARS-CoV.....	118
IX. DISCUSIÓN.....	121
1. ncRNAs DEL HOSPEDADOR EXPRESADOS EN PULMONES DE RATONES INFECTADOS POR SARS-CoV.....	122
2. ncRNAs DEL HOSPEDADOR DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN LA INFECCIÓN POR SARS-CoV-ΔE ATENUADO O SARS-CoV VIRULENTO.....	122
2.1 Predicción de potenciales mRNAs diana de los miRNAs diferencialmente expresados en la infección con el virus atenuado SARS-CoV-ΔE y virulento SARS-CoV.....	124
2.2 Estudio integrado de mRNAs y miRNAs diferencialmente expresados en la infección con el SARS-CoV virulento y el atenuado.....	126
2.3 Nuevas aproximaciones en la identificación de mRNAs diana de miRNAs.....	127
2.4 Regulación de la expresión génica por miRNAs en la infección viral.....	127
3. svRNAs IDENTIFICADOS EN LA INFECCIÓN POR SARS-CoV.....	128
3.1 Biogénesis de los svRNAs.....	130
3.2 Efecto de los svRNAs sobre el crecimiento de SARS-CoV en cultivos celulares.....	130
3.3 Efecto de los svRNAs de SARS-CoV en el silenciamiento de mRNAs diana en cultivos celulares.....	131
3.4 Función del svRNA-N en la infección de ratones.....	132
3.5 Predicción de dianas de los svRNAs.....	134
X. CONCLUSIONES.....	137
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	139
XII. ANEXO.....	165

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Características morfológicas y genéticas de los coronavirus.....	23
<b>Figura 2.</b> Ciclo infectivo de los coronavirus.....	25
<b>Figura 3.</b> Ruta canónica de biogénesis de miRNAs celulares y silenciamiento postranscripcional de la expresión génica.....	34
<b>Figura 4.</b> La regulación mediada por miRNAs conforma una compleja red de interacciones.....	36
<b>Figura 5.</b> Caracterización de la infección de ratones con el virus virulento SARS-CoV-wt o el virus atenuado SARS-CoV-ΔE.....	69
<b>Figura 6.</b> Análisis de la integridad del RNA de los pulmones de ratones infectados.....	70
<b>Figura 7.</b> Distribución de la longitud de las secuencias obtenidas por secuenciación masiva de los RNAs pequeños de pulmones de ratones infectados.....	72
<b>Figura 8.</b> Alineamiento de las secuencias de RNA de pequeño tamaño de los pulmones de ratones infectados obtenidas por secuenciación masiva.....	74
<b>Figura 9.</b> Definición de <i>locus</i> a partir de las secuencias obtenidas por secuenciación masiva.....	75
<b>Figura 10.</b> Visualización del alineamiento de las lecturas de las secuenciación masiva con el genoma del ratón.....	76
<b>Figura 11.</b> Expresión diferencial de RNAs pequeños en pulmones de ratones infectados con el virus virulento o con el atenuado.....	77
<b>Figura 12.</b> Expresión de miRNAs diferencialmente expresados en los pulmones de ratones infectados con el virus SARS-CoV atenuado y virulento.....	80
<b>Figura 13.</b> Red de interacciones de los miRNAs, genes diana y rutas funcionales reguladas durante la infección del SARS-CoV atenuado y virulento.....	81
<b>Figura 14.</b> Análisis funcional de los RNAs largos diferencialmente expresados en los pulmones de ratones infectados con el virus SARS-CoV-wt o con el mutante de delección sin proteína E SARS-CoV-ΔE.....	86
<b>Figura 15.</b> Alineamiento de las secuencias de RNAs pequeños de pulmones de ratón con el genoma del SARS-CoV.....	88
<b>Figura 16.</b> Detección mediante RT-qPCR de los svRNAs derivados de SARS-CoV en pulmones y suero de los ratones infectados.....	91
<b>Figura 17.</b> Detección por RT-qPCR de svRNAs derivados de SARS-CoV en células infectadas.....	93
<b>Figura 18.</b> Efecto de la inhibición de los svRNAs derivados de SARS-CoV en el crecimiento del virus en células DBT-mACE2 infectadas.....	95

<b>Figura 19.</b> Análisis del procesamiento de los svRNAs por la maquinaria celular de <i>splicing</i> de mRNAs.....	97
<b>Figura 20.</b> Contribución de las enzimas de la vía canónica de procesamiento de miRNAs celulares en la biogénesis de los svRNAs derivados de SARS-CoV durante la infección.....	100
<b>Figura 21.</b> Capacidad de reprimir la expresión de un mRNA marcador por los svRNAs.....	103
<b>Figura 22.</b> Análisis del efecto esponja de los svRNAs derivados de SARS-CoV sobre miRNAs celulares.....	105
<b>Figura 23.</b> Detección de gránulos de estrés implicados en el silenciamiento postranscripcional de mRNAs en células ST infectadas con el CoV TGEV.....	107
<b>Figura 24.</b> Estudio de la localización del svRNA-N en células DBT-mACE2 infectadas por SARS-CoV por hibridación <i>in situ</i> .....	108
<b>Figura 25.</b> Efecto de la inhibición del svRNA-N en ratones infectados con SARS-CoV.....	110
<b>Figura 26.</b> Efecto de la inhibición del svRNA-N en ratones infectados con SARS-CoV en la patología pulmonar macroscópica.....	112
<b>Figura 27.</b> Efecto de la inhibición del svRNA-N en ratones infectados con SARS-CoV en la histopatología pulmonar.....	113
<b>Figura 28.</b> Efecto de la inhibición del svRNA-N en la distribución pulmonar de la infección del SARS-CoV en ratones.....	115
<b>Figura 29.</b> Efecto de la inhibición de svRNA-N en ratones infectados con SARS-CoV en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias.....	116
<b>Figura 30.</b> Modelo de la función del svRNA-N durante la infección de SARS-CoV.....	118

---

**ÍNDICE DE TABLAS**

<b>Tabla I.</b> Ensayos TaqMan usados para la cuantificación por RT-qPCR de mRNAs celulares y RNAs pequeños (sRNA) virales y celulares.....	53
<b>Tabla II.</b> Oligonucleótidos usados para la cuantificación por RT-qPCR del RNA viral.....	54
<b>Tabla III.</b> Sondas usadas para la detección de svRNAs por <i>northern blot</i> .....	55
<b>Tabla IV.</b> Oligonucleótidos usados para la construcción de los fragmentos precursores de los RNAs virales pequeños (svRNAs).....	60
<b>Tabla V.</b> Secuencias complementarias de los svRNAs y los miRNAs controles positivos diseñados como diana en plásmidos para ensayos de represión con el gen reportero luciferasa.....	61
<b>Tabla VI.</b> Secuencias de miScript miRNA mimic e inhibidores de los svRNAs y miRNA control positivo.....	62
<b>Tabla VII.</b> Análisis de las secuencias de RNAs pequeños de los pulmones de ratones infectados con SARS-CoV-wt o SARS-CoV-ΔE obtenidas por secuenciación masiva.....	71
<b>Tabla VIII.</b> miRNAs de ratón diferencialmente expresados en los pulmones de ratones infectados con el virus virulento SARS-CoV wt a 2 ddi respecto a no infectados.....	78
<b>Tabla IX.</b> miRNAs de ratón diferencialmente expresados en los pulmones de ratones infectados con el virus atenuado SARS-CoV-ΔE respecto al virulento SARS-CoV wt a 2 ddi.....	79
<b>Tabla X.</b> Análisis de la expresión diferencial de mRNAs diana para miRNAs celulares diferencialmente expresados en los pulmones de ratones infectados con el virus atenuado SARS-CoV-ΔE respecto al virulento SARS-CoV wt a 2 ddi.....	84
<b>Tabla XI.</b> Selección de los diez RNAs virales pequeños (svRNAs) más abundantes en los pulmones de ratones infectados con SARS-CoV.....	89
<b>Tabla XII.</b> RNAs virales pequeños (svRNAs) identificados por secuenciación masiva en los pulmones de ratones infectados con SARS-CoV y caracterizados en esta memoria.....	90
<b>Tabla XIII.</b> Análisis por RT-PCR del procesamiento de secuencias precursoras de la expresión de los svRNAs clonadas en el plásmido pEM entre los exones 1 y 2 de dsRed.....	99





## **ABREVIATURAS**

---



---

ACE-2	enzima convertidora de angiotensina 2
Ago2	proteína argonauta 2
Akt	proteína kinasa B
ALI	daño pulmonar agudo
ARDS	síndrome de dificultad respiratoria aguda
ATP	adenosín trifosfato
BASC	células madre bronquioalveolares
BSA	albúmina de suero bovino
Calu-3	células de epitelio aéreo humano cultivadas
Cap	7-metil-guanosina
CCKR	receptor de colecistoquinina
CCL2	quimioquina con motivo C-C 2
CD4 y CD8	cúmulo de diferenciación 4 y 8
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementario
ceRNA	competidor endógeno de ácido ribonucleico
CoV	coronavirus
cpm	cuentas por millón
CS	secuencia central conservada
Ct	ciclo umbral
cTRS	secuencia complementaria a la secuencia reguladora de la transcripción
CXCL10	quimioquina con motivo C-X-C 10
DAPI	diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol
DBT	células tumorales de cerebro de ratón
ddi	días después de la infección
$\Delta E$	virus con delección en el gen E
DENV-2	virus dengue tipo 2
DEPC	dietilpirocarbonato
DMEM	medio Eagle modificado por Dulbbeco
DMSO	dimetilsulfóxido
DMV	vesículas de doble membrana
DNA	ácido desoxirribonucleico
dsRNA	ácido ribonucleico de doble cadena
DTT	1,4-diotreitol
E	proteína de la envuelta
EBER	RNAs no codificantes del virus Epstein-Barr
EBV	virus Epstein-Barr
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético

## Abreviaturas

---

EEO	electroendósmosis
EGF	factor de crecimiento epidérmico
ER	retículo endoplásmico
ERGIC	compartimento intermedio entre el retículo endoplásmico y el aparato de golgi
EV	enterovirus
FBS	suero fetal bovino
FC	magnitud del cambio
FDR	<i>false discovery rate</i> o p-valor ajustado. Proporción de falsos positivos
FU	unidad de fluorescencia
G418	geneticina 418
GNRH	receptor de la hormona liberadora de gonadotropina
GRCm38	genoma de referencia de ratón (ensamblado número 38)
gRNA	ácido ribonucleico genómico
HA	virus de la hepatitis A
HCoV	coronavirus humano
HCV	virus de la hepatitis C
hdi	horas después de la infección
HEPES	ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónido
HRP	peroxidasa de rábano picante
HSUR	RNAs no codificantes del virus herpes
HVS	virus herpes simple
IFN	interferón
IKB	inhibidor del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
IL	interleuquina
IP	inmunoprecipitación
IRES	sitio interno de entrada del ribosoma
IRS1	receptor del sustrato 1 e insulina
ISG	gen estimulado por interferón
Kb	kilobase
Kcal	kilocaloría
KDa	kilodalton
KSHV	virus herpes asociado al sarcoma de Kaposi
Kras	oncogen homólogo del sarcoma viral de rata Kirsten
LB	medio de cultivo Luria-Bertani
LNA	ácido nucleico bloqueado

---

lncRNA	ácido ribonucleico no codificante largo
log2	logaritmo en base 2
M	proteína de membrana
M24	placa de 24 pocillos
MA	adaptado a ratón
MAPK	proteína quinasa activada por mitógeno
MDCK	células caninas de riñón Madin-Darby
Mdi	multiplicidad de infección
Mef2c	factor potenciador miocito 2C
MERS	síndrome respiratorio de Oriente Medio
MHV	virus de la hepatitis murina
miRNA	micro ácido ribonucleico
mock	control sin tratamiento o sin infección
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
MX1	proteína inducida por interferón de unión a GTP
MYD88	proteína de respuesta de diferenciación mieloides 88
N	nucleoproteína
ncRNA	ácido ribonucleico no codificante
neg	negativo
NF-κB	factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NLR	receptor tipo NOD
NOD	dominio de oligomerización de nucleótido
nrRNA	ácido ribonucleico no relacionado o control negativo
nsp	proteína no estructural
nt	nucleótido
oncomiRNA	micro ácido ribonucleico oncogénico
ORF	fase de lectura abierta
p100	placa de cultivo de 100 mm de diámetro
PASR	ácidos ribonucleicos pequeños asociados a promotores
pb	pares de bases
PBM	motivo de unión a PDZ
PBS	tampón fosfato salino
PDZ	proteínas de densidad post-sináptica, supresora de tumores en <i>Drosophila</i> y zonula occludens-1
PFA	paraformaldehído
PI3K	fosfoinositol-3-quinasa

## Abreviaturas

---

piRNA	PIWI ácido ribonucleico
PKR	proteína kinasa R
poliA	tramo de poliadeninas
pp1a	poliproteína 1a
pre-miRNA	precursor de micro ácido ribonucleico
pri-miRNA	micro ácido ribonucleico primario
PRKCE	proteína quinasa C tipo epsilon
PRRSV	virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino
RFP	proteína roja fluorescente
RIG-I	gen 1 inducido por ácido retinoico
RIN	número de integridad del ácido ribonucleico
RISC	complejo inductor del silenciamiento de ácido ribonucleico
RLR	receptores tipo RIG-I
RNA	ácido ribonucleico
RNAi	sistema interferente de ácido ribonucleico
RS	sentido reverso
rRNA	ácido ribonucleico ribosomal
RTC	complejo de replicación-transcripción
RT-PCR	retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa
S	proteína de la espícula
SARS	síndrome respiratorio agudo y grave
SDS	dodecilsulfato sódico
sfRNA	ácido ribonucleico pequeño de flavivirus
SG	gránulo de estrés
sgmRNA	ácido ribonucleico mensajero subgenómico de polaridad positiva
sgRNA	ácido ribonucleico subgenómico de polaridad negativa
siRNA	ácido ribonucleico interferente pequeño
sncRNA	ácido ribonucleico no codificante pequeño
snoRNA	ácido ribonucleico nucleolar pequeño
snRNA	ácido ribonucleico nuclear pequeño
SOB	medio superóptimo de crecimiento de bacterias
SSC	citrato de sodio salino
STAT3	transductor de la señal y activador de la transcripción 3
svRNA	ácido ribonucleico viral pequeño
TAE	medio trisacetato con ácido etilendiaminotetraacético
TBS	medio trisclorhídrico salino
tdi	tiempo después de la infección

---

TGEV	virus de la gastroenteritis porcina transmisible
TGF- $\beta$	factor de crecimiento transformable beta
TLR	receptor tipo Toll
T <sub>m</sub>	temperatura de fusión
TNF	factor necrótico tumoral
tRNA	ácido ribonucleico transferente
TRS	secuencia reguladora de la transcripción
TRS-B	secuencia reguladora de la transcripción que precede a cada gen
TRS-L	secuencia reguladora de la transcripción de la secuencia líder
TTBS	tampón trisclorhídrico salino con Tween
u	unidad de actividad enzimática
ufp	unidad formadora de placa
UTR	región no traducible
VARNA	ácido ribonucleico no codificante asociado a virus
VEGF	factor de crecimiento endotelial vascular
viRNA	ácido ribonucleico interferente viral
VS	sentido viral
VSV	virus de la estomatitis vesicular
WNV	virus del Nilo occidental
wt	<i>wild type</i> o silvestre
Xbp1	proteína 1 de unión a una caja X
XRN1	5'-3' exorribonucleasa 1





## SUMMARY

---



Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) causes lethal disease in humans, which is characterized by exacerbated inflammatory response and extensive lung pathology. The relevance of host and viral small non-coding RNAs (ncRNAs) in SARS-CoV pathology has been addressed by deep sequencing RNAs from the lungs of infected mice, which reproduce the pulmonary pathology observed in humans. The impact of host ncRNAs in SARS-CoV pathogenesis was studied by analyzing the miRNAs differentially expressed in mice infected with the virulent SARS-CoV-wt or the attenuated mutant SARS-CoV-ΔE, only differing in the presence of the E protein virulence factor. Potential targets of these differentially expressed miRNAs were involved in biological pathways enriched for inflammatory processes and, in particular, inflammation mediated by cytokines, suggesting that cellular miRNAs altered by SARS-CoV infection in the presence of E protein contributed to the regulation of the lung inflammatory pathology. Bioinformatics analysis of RNA sequences revealed for the first time in coronaviruses small RNAs generated from the SARS-CoV genome (svRNAs) in infected mouse lungs. Three abundant 18-22 nt svRNAs derived from the nsp3 (svRNA-nsp3.1 and nsp3.2) and N (svRNA-N) genomic regions of SARS-CoV, which represented 18% out of the total small viral sequences, were selected for further study. The generation of these svRNAs was confirmed by RT-qPCR in different cell types infected either by wt or E gene-mutant SARS-CoVs. Production of SARS-CoV svRNAs was cell type and host species independent, but it was dependent on the extent of viral replication. Biogenesis of svRNAs was independent of host RNase III nucleases responsible for miRNA canonical processing, suggesting the requirement of alternative mechanisms involving viral proteins or cellular factors induced during infection. The production of svRNAs in cell culture infection had a positive, although modest effect on SARS-CoV growth. svRNAs specifically repressed the expression of mRNA targets with complementary 3' UTR sequences, suggesting a post-transcriptional silencing effect similar to cellular miRNAs. svRNA-N also silenced mRNA target expression during infection. *In vivo* inhibition of svRNA-N with antisense oligonucleotides (antagomirs) intranasally inoculated in mice prior to SARS-CoV infection significantly reduced inflammatory cell infiltration and edema induced by SARS-CoV without affecting viral titers. Accordingly, a significant decrease in the expression of pro-inflammatory cytokines CCL2, IL-6 and CXCL10, associated with SARS-CoV pathology, was also observed. Together, these results indicate that svRNAs generated from the SARS-CoV genome contribute to lung inflammatory pathology and highlight the potential of svRNA-N antagomirs in antiviral therapy.



# RESUMEN

---



El virus causante del síndrome respiratorio agudo y grave (SARS-CoV) produce una enfermedad mortal caracterizada por una respuesta inflamatoria exacerbada y elevada patología pulmonar. En esta tesis se ha investigado la relevancia de los RNAs no codificantes (ncRNAs) del hospedador y del virus en la patología del SARS-CoV mediante secuenciación masiva de los RNAs de pulmones de ratones infectados, que reproducen la patología pulmonar observada en humanos. El impacto de los ncRNAs del hospedador en la patogénesis del SARS-CoV se ha estudiado analizando los miRNAs diferencialmente expresados en pulmones de ratones infectados con el virus virulento SARS-CoV-wt o el atenuado SARS-CoV-ΔE, que solo difieren en la presencia de la proteína E, un factor de virulencia. Las dianas potenciales de los miRNAs diferencialmente expresados estaban implicadas en rutas celulares significativamente enriquecidas en procesos inflamatorios, y en particular, en inflamación mediada por citoquinas, sugiriendo que los miRNAs alterados en la infección en presencia de la proteína E participan en la regulación de la patología pulmonar inflamatoria. El análisis bioinformático de las secuencias RNA reveló por primera vez en coronavirus la existencia de ncRNAs pequeños derivados del genoma de SARS-CoV (svRNAs) en los pulmones de ratones infectados. Se seleccionaron tres svRNAs entre los más abundantes, que representaban un 18% del total de las secuencias pequeñas derivadas del virus. Los svRNAs tenían un tamaño de 18-22 nt y derivaban de los genes nsp3 (svRNA-nsp3.1 and nsp3.2) y N (svRNA-N). Los tres svRNAs se detectaron por RT-qPCR en distintos tipos celulares infectados con el SARS-CoV-wt o con mutantes del gen E y su producción dependía de los niveles de replicación viral. La biogénesis de los svRNAs era independiente de las RNAsas III celulares responsables del procesamiento canónico de miRNAs, sugiriendo el requerimiento de proteínas virales o celulares inducidas durante la infección para su producción. Los svRNAs tenían un efecto positivo, aunque modesto, en el crecimiento viral en cultivos celulares. Los tres svRNAs reprimieron específicamente la expresión de mRNAs con secuencias diana complementarias en el 3' UTR, sugiriendo un efecto de silenciamiento postranscripcional similar al de los miRNAs celulares. Además, el svRNA-N también silenció la expresión de mRNAs diana durante la infección. La inhibición del svRNA-N *in vivo* con oligonucleótidos antisentido (antagomirs) administrados intranasalmente antes de la infección redujo significativamente el edema y los infiltrados de células inflamatorias inducidos por SARS-CoV, destacando que no se afectó el título viral. Además, se observó una reducción significativa de las citoquinas pro-inflamatorias CCL2, IL-6 y CXCL10 asociadas con la patología del SARS-CoV. En conjunto, estos resultados indicaron que los svRNAs derivados del genoma de SARS-CoV contribuyen a la patología inflamatoria pulmonar e identifican a los oligonucleótidos antisentido frente a svRNA-N como potencial terapia antiviral.





# INTRODUCCIÓN

---



## 1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS CORONAVIRUS

### 1.2. Clasificación taxonómica

Los coronavirus (CoV) son virus con envuelta y con un genoma RNA de cadena sencilla y polaridad positiva. Pertenecen a la familia *Coronaviridae*, incluida en el orden Nidovirales. Este orden comprende cuatro familias relacionadas de forma distante: *Coronaviridae*, *Arteriviridae*, *Roniviridae* y *Mesoniviridae* (Fig. 1A), cuya característica común es la producción de RNAs mensajeros (mRNAs) subgenómicos 3' coterminales o anidados, lo que da nombre al orden (Carstens, 2010; de Groot y col., 2012; Enjuanes y col., 2008b). Los nidovirus se encuentran entre los virus RNA más complejos (Gorbalenya y col., 2006) e infectan un amplio rango de hospedadores que incluye animales invertebrados (*Roniviridae* y *Mesoniviridae*) y vertebrados (*Arteriviridae* y *Coronaviridae*).

Dentro de la familia *Coronaviridae*, la subfamilia *Coronavirinae* está constituida por los géneros *Alfacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus* ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , y  $\delta$ , respectivamente), que incluyen más de 20 especies que infectan vertebrados, entre ellos mamíferos y aves (de Groot y col., 2013). El género *Betacoronavirus* incluye el CoV humano (HCoV) causante del síndrome respiratorio agudo y grave (SARS-CoV) (Drosten y col., 2003; Rota y col., 2003; Stadler y col., 2003).

### 1.2. Epidemiología

Tradicionalmente, los CoVs humanos se asociaban con infecciones respiratorias leves. De hecho, los virus HCoV-229E y HCoV-OC43 son responsables del 15% de los resfriados comunes y ocasionalmente de enfermedades pulmonares más graves en recién nacidos, personas mayores o individuos inmunodeprimidos (Garbino y col., 2006; McIntosh y col., 1969). Sin embargo, en el año 2002, la emergencia del SARS-CoV, que se diagnosticó en 8.422 enfermos de 32 países y dejó un balance de 916 fallecidos (en torno a un 10% mortalidad), cambió la percepción de los CoVs y mostró su potencial altamente patogénico. Además, esta epidemia atrajo la atención mediática y científica hacia los CoVs y llevó a la identificación de nuevos CoVs humanos (Drosten y col., 2003; Rota y col., 2003; Stadler y col., 2003) como el HCoV-NL63 y el HCoV-HKU1, causantes de bronquiolitis y neumonías relativamente graves (van der Hoek y col., 2004; Woo y col., 2005). En 2012 emergió un nuevo CoV humano, el virus causante del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) (Annan y col., 2013; Assiri y col., 2013), que produce neumonías graves acompañadas ocasionalmente de patología renal. Hasta este momento, se han registrado 1.936 casos en 27 países con más de 690 muertes

([http://www.who.int/csr/disease/coronavirus\\_infections/en/](http://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/en/), 11 Abril de 2017), por lo que se estima una mortalidad de más del 35%, si bien el número de casos continúa en aumento.

SARS-CoV y MERS-CoV son virus zoonóticos que se han transmitido al hombre desde otras especies animales, lo que confirma la capacidad de los CoVs para cruzar la barrera de especie y potencia su relevancia como patógenos humanos emergentes (Coleman y Frieman, 2014; Graham y col., 2013). La epidemia del SARS-CoV fomentó la búsqueda del posible reservorio animal del virus. Se identificaron CoVs muy similares al SARS-CoV en mapaches, tejones chinos, y especialmente en civetas, que se comercializaban en mercados de las zonas de China en las que se desarrolló la epidemia. Sin embargo, no se detectaron CoVs similares al SARS-CoV en ejemplares silvestres de estos animales. Además, el análisis de la secuencia de aislados virales de civetas indicaba que el virus todavía se estaba adaptando a estos animales (Kan y col., 2005; Song y col., 2005). Estos hallazgos sugerían que las civetas, los tejones y los mapaches podrían actuar como hospedadores intermedios. En 2005 se detectaron en murciélagos virus similares al SARS-CoV identificado en civetas y humanos (Lau y col., 2005; Li y col., 2005). En muchos casos estos murciélagos también se vendían en los mismos mercados que las civetas (Lau y col., 2005; Li y col., 2005). Recientemente se ha determinado que algunos CoVs aislados de murciélagos, similares al causante del SARS, también se replican en células humanas (Ge y col., 2013). Con todos estos datos se ha postulado que el virus se habría transmitido desde los murciélagos al hombre bien a través de las civetas, o incluso directamente. El análisis masivo de muestras de murciélagos de distintos continentes del planeta permitió identificar CoVs de distintos géneros similares a los que infectan humanos o animales (Annan y col., 2013; Chu y col., 2008; Drexler y col., 2010; Falcon y col., 2011; Graham y col., 2013; Muller y col., 2007; Quan y col., 2010). Actualmente, hay evidencias suficientes para sugerir que los CoVs de murciélago son los ancestros más recientes de los virus integrantes de los géneros *Alfacoronavirus* y *Betacoronavirus* (Huynh y col., 2012; Woo y col., 2012). Los murciélagos, con más de 1.100 especies distribuidas por la mayor parte del planeta, representan un reservorio idóneo en el que pueden ocurrir fenómenos de recombinación entre distintos CoVs, que dan lugar a nuevos virus potencialmente patógenos para humanos u otros animales. El acercamiento progresivo de los asentamientos humanos al hábitat de estos animales ha aumentado las probabilidades de transmisión de virus causantes de enfermedades por salto entre especies. Por ello, el estudio de los mecanismos de virulencia de estos virus así como el desarrollo de estrategias efectivas para su prevención y terapia es una prioridad en salud pública.

### 1.3. Estructura del virión

Los CoVs son virus esféricos, de entre 120 y 160 nm de diámetro, que presentan una envuelta lipídica en la que se inserta un conjunto de proteínas estructurales comunes a todos los CoVs: la proteína de la espícula (S), la proteína de membrana (M) y la proteína de la envuelta (E) (de Groot y col., 2012) (Fig. 1B). Además, algunos *Betacoronavirus* presentan en la envuelta viral otras proteínas específicas de especie, como las proteínas accesorias 3a, 6, 7a y 7b en el caso del SARS-CoV (Huang y col., 2006; Huang y col., 2007; Schaecher y col., 2007; Shen y col., 2005). En el interior del virión se encuentra la nucleocápsida, formada por el RNA genómico (gRNA) unido a la proteína de la nucleocápsida (N) (Fig. 1B) (de Groot y col., 2012).

La proteína S se asocia en trímeros formando las espículas, que confieren aspecto de corona al virión, lo que da nombre a los coronavirus (Delmas y Laude, 1990). La proteína S es una glicoproteína de membrana de tipo I de alrededor de 200 kDa, que media la unión al receptor celular, e induce la fusión de las membranas celular y viral, permitiendo la entrada del virus en la célula (Belouzard y col., 2012; Gallagher y Buchmeier, 2001). Esta proteína es la responsable de la especificidad en el tropismo de tejido y de especie, y la principal inductora de anticuerpos neutralizantes (Delmas y col., 1986; Enjuanes y col., 1987; Jimenez y col., 1986; Sanchez y col., 1990).

La proteína M es la más abundante en la envuelta viral. En SARS-CoV es una glicoproteína de 29 kDa, con tres dominios transmembrana, implicada en los procesos de morfogénesis y ensamblaje viral (Nguyen y Hogue, 1997). Esta proteína también induce la producción de anticuerpos neutralizantes, aunque en menor grado que la proteína S (Jimenez y col., 1986).

La proteína E es una proteína transmembrana de unos 10 kDa que se encuentra en los viriones en un número bajo de copias (20 moléculas por virión), pero se acumula abundantemente en la célula infectada donde participa, junto con la proteína M, en el ensamblaje y liberación de viriones (Maeda y col., 2001; Nguyen y Hogue, 1997; Nieto-Torres y col., 2011; Ruch y Machamer, 2012). Su requerimiento para la infectividad del virus es variable dependiendo de la especie de CoV. En el caso del virus de la gastroenteritis porcina transmisible (TGEV) y del MERS-CoV, la eliminación de la proteína E resulta en virus competentes en replicación pero deficientes en propagación, mientras que en el virus de la hepatitis murina (MHV) o el SARS-CoV, la proteína E no es absolutamente esencial para la maduración y liberación de partículas infectivas (Almazan y col., 2013; DeDiego y col., 2011; Ortego y col., 2002). Además, nuestro grupo ha demostrado que la proteína E de SARS-CoV es un factor de virulencia que forma canales iónicos (Verdia-Baguena y col., 2012) y modula la inflamación y la respuesta celular a estrés de retículo (DeDiego y col., 2011; Jimenez-

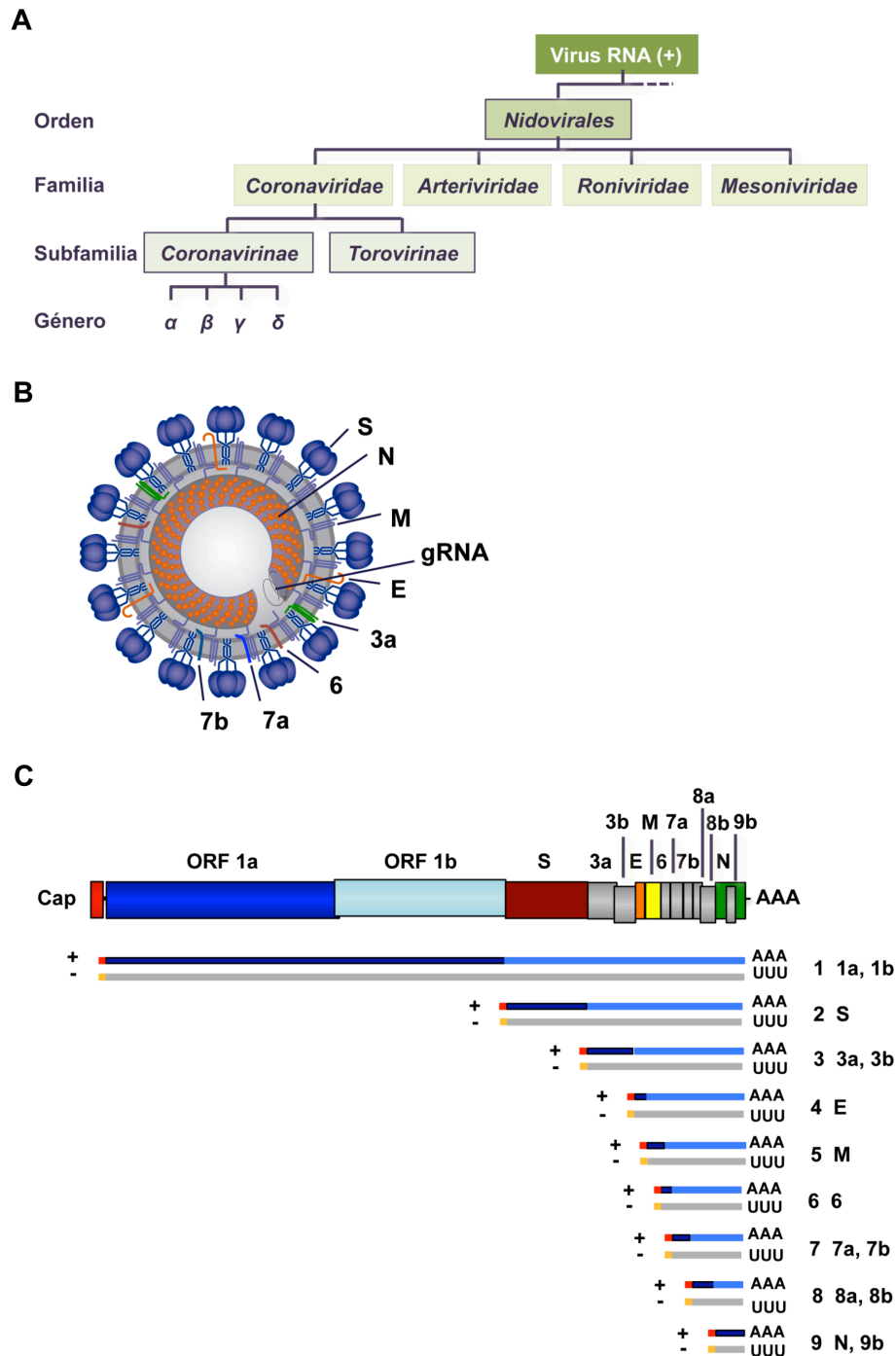
Guardeño y col., 2014; Nieto-Torres y col., 2014; Nieto-Torres y col., 2015; Surya y col., 2015; Verdia-Baguena y col., 2012), como se describirá en detalle más adelante.

La proteína N es una fosfoproteína de unos 40 kDa que se une al gRNA viral para formar la nucleocápsida helicoidal (Laude y Masters, 1995). Además de su función estructural, la proteína N tiene actividad chaperona de RNA (Zuñiga y col., 2009; Zuñiga y col., 2007) y desempeña un papel fundamental en la síntesis del RNA viral (Almazan y col., 2004; Schelle y col., 2005). En particular, nuestro grupo ha descrito que la proteína N es esencial para la transcripción discontinua de CoVs, probablemente porque facilita el cambio de molde durante este proceso (Zuñiga y col., 2010). Además, la proteína N interviene en la interacción virus-hospedador, modulando numerosos procesos celulares como la respuesta antiviral mediada por interferón (IFN) de tipo I (Almazan y col., 2004; Lu y col., 2011; Thiel y col., 2003; Ye y col., 2007b; Zuñiga y col., 2007).

### 1.4. Estructura del genoma y expresión génica

El genoma de los CoVs es una molécula de RNA de polaridad positiva de unas 30 kb, que representa el genoma viral de RNA de mayor tamaño conocido (de Groot y col., 2012; Enjuanes y col., 2008b). Estructuralmente, el genoma de los CoV es muy similar a los mRNAs celulares, dado que posee una estructura 7-metilguanosina (cap) en su extremo 5' (Page y col., 1990), está poliadenilado en su extremo 3' (Jacobs y col., 1986) y presenta regiones no traducidas en ambos extremos (5' UTR y 3' UTR) de entre 210 y 530 nucleótidos de longitud (Brian y Baric, 2005; Jacobs y col., 1986; Page y col., 1990).

La organización básica del genoma es común a todos los miembros del orden *Nidovirales* (Fig. 1C). Las dos terceras partes, aproximadamente, del extremo 5' del genoma codifican la replicasa viral en dos fases de lectura solapantes (ORF 1a y ORF 1b), que se traducen directamente a partir del gRNA al comienzo de la infección. A partir de ambas ORFs, mediante un cambio en la fase de lectura del ribosoma (-1) se sintetizan dos poliproteínas, pp1a y pp1ab, de 500 y 800 kDa, respectivamente, que se procesan proteolíticamente para generar 16 proteínas no estructurales (nsps) implicadas en los procesos de replicación y transcripción (Gorbalenya y col., 1989; Ziebuhr, 2005; Ziebuhr y col., 2000). El tercio del extremo 3' del genoma codifica las proteínas estructurales S, E, M y N y un conjunto de proteínas accesorias cuyo número e identidad difieren entre las distintas especies de CoV, siendo el SARS-CoV el que presenta el mayor número de ellas: 3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8a, 8b y 9b (Narayanan y col., 2008).



**Figura 1. Características morfológicas y genéticas de los coronavirus.** (A) Clasificación taxonómica de los CoVs en el orden Nidovirales. Se indica la familia, subfamilia y los géneros de los CoVs. (B) Esquema de un virión del SARS-CoV. En la envuelta se insertan las proteínas S, M y E, comunes a todos los CoVs, y las proteínas 3a, 6, 7a y 7b, específicas del SARS-CoV. En el interior, se muestra la nucleocápsida, una estructura helicoidal formada por el genoma viral (gRNA) asociado a la proteína N. (C) organización genómica del SARS-CoV. Arriba, esquema del genoma del SARS-CoV en el que se representan los genes con tamaños proporcionales. Las ORF1a y 1b ocupan dos terceras partes del genoma y codifican las poliproteínas pp1a y pp1ab de la replicasa, respectivamente. El tercio restante contiene los genes de las proteínas estructurales S, E, M y N, en color, y de las proteínas accesorias 3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8a, 8b y 9b, en gris en la figura. Abajo, representación de la colección de RNAs subgenómicos (sgmRNAs) positivos con extremos 5' y 3' co-terminales con el genoma. En color azul oscuro se indica el gen que se traduce. El cuadrado rojo del extremo 5' indica la secuencia líder. Las líneas grises indican los sgmRNAs negativos complementarios intermediarios en la síntesis de RNA. AAA, poliA.

La replicación del RNA genómico es un proceso de síntesis continua a través de un RNA intermediario de polaridad negativa, regulado principalmente por secuencias de RNA en los extremos 5' y 3' del genoma (Sola y col., 2015).

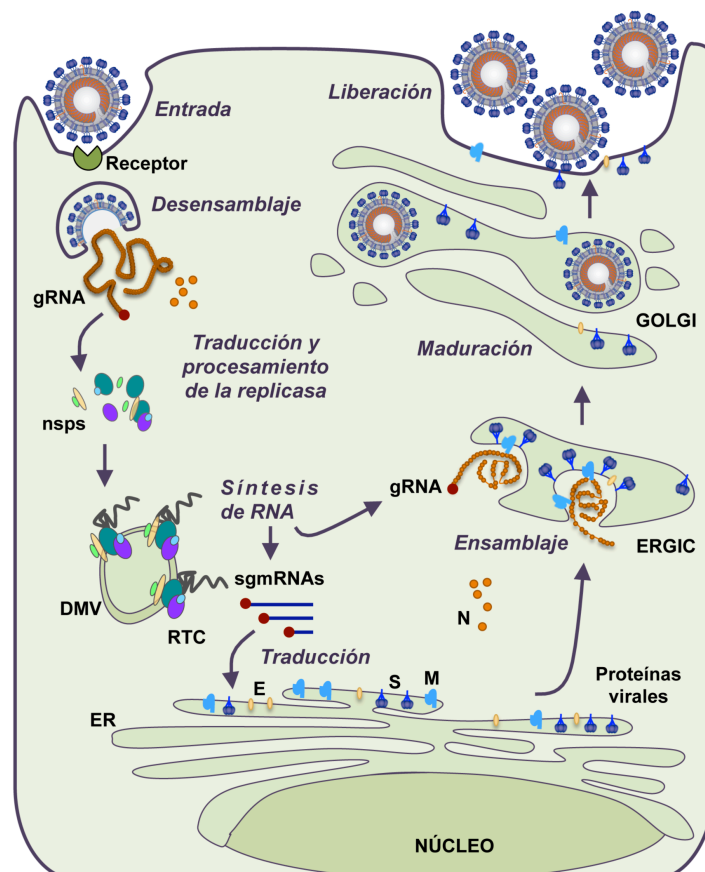
Los genes del tercio 3' terminal del genoma se expresan a partir de una colección de mRNAs subgenómicos (sgmRNAs) 5' y 3' coterminales de distintos tamaños. Estos sgmRNAs son estructuralmente policistrónicos pero funcionalmente monocistrónicos dado que, por lo general, únicamente se traduce la ORF más cercana al extremo 5' (Fig. 1C) (Masters, 2006). Todos los sgmRNAs presentan en su extremo 5' una secuencia líder, de 72 nucleótidos en el SARS-CoV, que también se encuentra en el extremo 5' del gRNA. Esta secuencia se incorpora a los sgmRNAs mediante un proceso de transcripción discontinua que es único entre los virus RNA. La transcripción en CoVs está dirigida por las secuencias reguladoras de la transcripción (TRSs), formadas por un hexanucleótido central conservado (CS), flanqueado por secuencias variables 5' y 3'. Las TRSs se localizan en el extremo 3' del líder (TRS-L) y precediendo a cada uno de los genes virales (TRS-B, TRS del *body*) (Enjuanes y col., 2006; Sawicki y col., 2007; Sola y col., 2005; Zuñiga y col., 2004). El proceso de transcripción se inicia copiando el extremo 3' del genoma hasta alcanzar las TRS-B, que actuarían como señales de atenuación o parada para la polimerasa viral. Desde las TRS-B se produce el cambio de molde del RNA naciente de polaridad negativa con la secuencia complementaria a la TRS-B (cTRS-B) en su extremo 3' hibridando con la TRS-L y copiando la secuencia del líder, completándose los RNAs subgenómicos (sgRNAs) de polaridad negativa. Éstos actúan de molde para la síntesis de los sgmRNAs de polaridad positiva (Enjuanes y col., 2007). El proceso de cambio de molde está regulado por varios factores, como la complementariedad entre la TRS-L y la cTRS-B, interacciones RNA-RNA a larga distancia que permiten la aproximación en el espacio de regiones distales del genoma, o interacciones RNA-proteína (Mateos-Gomez y col., 2013; Mateos-Gomez y col., 2011; Sola y col., 2011).

### 1.5. Ciclo infectivo

El ciclo infectivo de los CoVs comienza con la unión de la proteína S del virus al receptor celular que se encuentra en la membrana plasmática, lo que permite la entrada del virus en la célula mediante endocitosis (Fig. 2). En el caso del SARS-CoV el receptor celular es la enzima convertidora de angiotensina 2 humana (hACE2) (Li y col., 2003; Wong y col., 2004). Posteriormente, la envuelta viral se fusiona con la membrana del endosoma, y se produce el desensamblaje del virión y la liberación del genoma viral al citoplasma, donde se traduce dando lugar a las poliproteínas pp1a y pp1ab (Lai y Cavanagh, 1997; Perlman y Netland, 2009). Éstas se autoprocenan por



proteasas virales, generando 16 nsps que, junto con la proteína N y proteínas celulares, forman el complejo de replicación-transcripción (RTC). Este complejo se ensambla en vesículas de doble membrana (DMVs) originadas a partir del retículo endoplasmático celular (ER) (Knoops y col., 2008), donde se produce la síntesis de RNA, que incluye la replicación del genoma viral y la transcripción de los sgRNAs (Enjuanes y col., 2006; Sawicki y Sawicki, 1990; Zuñiga y col., 2010). A partir de los sgRNAs se traducen las proteínas virales estructurales y accesorias. Las proteínas S, M y E se integran en la membrana del ER y se transportan hasta las cisternas del compartimento intermedio (ERGIC) (Stern y col., 2007; Tooze y col., 1984). Paralelamente, la proteína N se asocia con los genomas progenie formando las nucleocápsidas helicoidales, que se incorporan en las partículas virales a través de la interacción entre la proteína N y el dominio C-terminal de la proteína M. Esta interacción conduce a la invaginación de la membrana del ERGIC alrededor de las nucleocápsidas, formando los viriones inmaduros (Narayanan y Makino, 2001; Sturman y col., 1980). Los viriones progenie son transportados a través de las cisternas del aparato de Golgi, donde se produce su maduración conforme progresan a través de la ruta secretora (Salanueva y col., 1999). Finalmente, las vesículas que contienen los viriones maduros se fusionan con la membrana plasmática y la progenie viral se libera al medio extracelular (Tooze y col., 1987).



**Figura 2. Ciclo infectivo de los coronavirus.** El virión entra en la célula por endocitosis mediada por unión al receptor celular ACE2 y se desensambla liberando el genoma al citoplasma, donde se traducen las ORF1a y ORF1b. Las poliproteínas del gen de la replicasa pp1a y pp1ab se autoprocen y sus subunidades o proteínas no estructurales (nsps) forman los complejos de síntesis de RNA en las vesículas de doble membrana (DMV) en las que se produce la replicación del gRNA y la transcripción de los sgRNAs (RTC). Los RNAs subgenómicos virales se traducen en el retículo endoplasmático (ER) y las proteínas estructurales S, M y E se integran en la membrana del ER. Después se transportan a las cisternas del compartimento intermedio (ERGIC), junto con las nucleocápsidas helicoidales formadas por el RNA genómico viral y la proteína N, donde comienza el ensamblaje de los viriones inmaduros. Los viriones maduran siguiendo la ruta secretora a través del aparato de Golgi (AG) y se liberan al exterior al fusionarse la membrana plasmática con la de las vesículas del AG.

## 2. EL SÍNDROME RESPIRATORIO AGUDO Y GRAVE

### 2.1. Patología pulmonar causada por el SARS-CoV

El síndrome respiratorio agudo y grave causado por el SARS-CoV se caracteriza como una neumonía atípica de curso muy heterogéneo, que en parte depende de la intensidad de la respuesta del hospedador a la infección (Tang, 2009). La enfermedad cursa inicialmente con fiebre, mialgia, malestar general, escalofríos, estornudos y ocasionalmente diarrea (Zhao y col., 2003). Un tercio de los pacientes infectados se recuperan, mientras que el resto sufren fiebres persistentes, taquipnea e hipoxemia, necesitando muchas veces cuidados intensivos y respiración asistida. En el 10% de los pacientes jóvenes y en más del 50% de personas mayores de 65 años la enfermedad termina produciendo fallo respiratorio, fallo multiorgánico y sepsis que conducen a la muerte (Donnelly y col., 2003). Algunos marcadores asociados con un curso severo y fatal de la enfermedad incluyen además de la edad, el elevado número de neutrófilos y de lactato deshidrogenasa en suero (Tang, 2009).

El análisis histopatológico de muestras de pulmón de pacientes fallecidos por el SARS reveló la presencia de daño alveolar difuso, descamación de los epitelios pulmonares, formación de membranas hialinas y acumulación de edema (Franks y col., 2003; Nicholls y col., 2003; Peiris y col., 2003). Estos signos inflamatorios son característicos de las patologías conocidas como daño pulmonar agudo (ALI) y su forma más severa, el síndrome de dificultad respiratoria aguda (*acute respiratory distress syndrome*, ARDS). El ARDS, ocasionado frecuentemente por infecciones que causan neumonía y otras veces por traumas severos o tóxicos, afecta anualmente a más de 200.000 personas sólo en Estados Unidos, causando la muerte del 40% de los pacientes (Matthay y Zemans, 2011). El virus SARS-CoV infecta células bronquiales y bronquiolares, células alveolares de tipo I y II y, de forma menos productiva, macrófagos alveolares (Frieman y col., 2008; Hsiao y col., 2005; Nicholls y col., 2006; Shieh y col., 2005; Ye y col., 2007a). Los epitelios respiratorios infectados producen

citoquinas, que activan una respuesta inflamatoria, amplificada por los macrófagos. Las citoquinas atraen quimiotácticamente células leucocitarias, principalmente neutrófilos, hacia los pulmones infectados. Una vez allí, los neutrófilos liberan compuestos oxidantes, radicales libres, proteasas, leucotrienos y otras moléculas pro-inflamatorias que aumentan la permeabilidad del endotelio vascular causando la extravasación masiva de neutrófilos y de líquido hacia el parénquima pulmonar (Matthay y Zemans, 2011). La acumulación de un edema rico en proteínas en las vías respiratorias impide un intercambio gaseoso eficiente, ocasionando hipoxemia y eventualmente la muerte del individuo afectado.

## **2.2. Bases moleculares de la patología**

La respuesta inmune innata representa la primera línea de defensa frente a las infecciones virales (Parkin y Cohen, 2001). Es responsable de elaborar un proceso inflamatorio clave en la resolución de la infección local y de estimular la respuesta inmune adaptativa, que participará más específica y activamente en re-infecciones posteriores. La respuesta inmune innata no es específica de patógenos, sino que se activa inicialmente por el reconocimiento de patrones moleculares asociados a la infección, principalmente a través de tres tipos de receptores: (1) Tipo *Toll* (TLR); (2) Tipo gen inducible por ácido retinoico I (RIG-I) o RLR; y (3) Tipo dominio de oligomerización de nucleótido (NOD) o NLR. Como consecuencia de su activación, se inducen cascadas de señalización que activan a factores de transcripción, como el factor regulador de interferón (IFN) 3 (IRF3) y el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- $\kappa$ B). IRF3 promueve la producción de IFN de tipo I, mientras que NF- $\kappa$ B induce la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, que modulan la respuesta inflamatoria (Thiel y Weber, 2008). Las moléculas de IFN I ( $\alpha/\beta$ ) se secretan y se unen a sus receptores en otras células vecinas en las que la cascada de señalización JAK-STAT induce la expresión de genes estimulados por IFN (ISG), que ejecutan acciones antivirales e inmunomoduladoras.

El balance de los componentes pro- y anti-inflamatorios de la respuesta inmune innata inducida es crítico en la evolución del proceso infeccioso y el desarrollo de la enfermedad. Mientras que una respuesta inflamatoria regulada es muy efectiva en el control de la infección local, la descompensación de alguno de sus componentes puede conducir a patología inflamatoria. De hecho, en los pacientes que morían por SARS-CoV se detectaban en sangre altos niveles de citoquinas pro-inflamatorias de fase temprana como interleuquina (IL) IL-1 $\beta$ , el factor necrótico tumoral (TNF), así como las de fase tardía IL-6, y las quimioquinas CXCL10 y CCL2 e IFN- $\gamma$  (Tang,

2009). Estos mediadores de la respuesta inmune innata también estaban aumentados en el tejido pulmonar y jugaban un papel fundamental en la patología de la enfermedad (Channappanavar y col., 2016; Tisoncik y col., 2012).

Por otra parte, los síntomas respiratorios del SARS se agravan a tiempos tardíos de la infección, incluso después de que el virus se haya eliminado del organismo, lo que indica que el síndrome respiratorio agudo tiene un fuerte componente inmunopatogénico (Perlman y Netland, 2009). Los coronavirus SARS-CoV, MERS-CoV y otros virus respiratorios altamente patogénicos, como algunas cepas de gripe, activan una respuesta pro-inflamatoria exacerbada en el parénquima pulmonar, asociada con la destrucción de las barreras epiteliales y la severidad de la enfermedad (Tisoncik y col., 2012).

### 2.3. Modelos animales

El establecimiento de modelos animales para el SARS-CoV ha sido clave para el estudio de los mecanismos moleculares de la patogénesis viral y la búsqueda de vacunas o terapias frente a la enfermedad. Aunque el SARS-CoV replica de forma eficiente en ratones, hámsters, hurones, gatos, civetas y primates, estos modelos solo reproducen parcialmente los síntomas de la enfermedad humana. Únicamente los primates no humanos susceptibles a la infección por SARS-CoV como el macaco *Rhesus*, el mono *cynomolgus*, el tití, y el mono verde africano (Fouchier y col., 2003; Greenough y col., 2005; McAuliffe y col., 2004) desarrollan cambios histopatológicos en el pulmón, que incluyen el daño alveolar difuso y la infección de células alveolares. Además, al igual que sucede en humanos, la enfermedad es más grave en los animales de edad avanzada. Sin embargo, el coste y la baja disponibilidad de estos animales, así como el hecho de tratarse de primates, ha limitado su uso y ha hecho necesaria la búsqueda de modelos animales de pequeño tamaño.

Los ratones son susceptibles a la infección por cepas epidémicas del SARS-CoV, como la cepa Urbani, capaces de usar eficientemente el receptor ACE2 murino (mACE2) (Graham y col., 2013). Sin embargo, únicamente experimentan una enfermedad respiratoria moderada y con pérdida de peso muy limitada (<5%). Para mejorar el modelo murino de forma que reprodujera la enfermedad en humanos se obtuvo un SARS-CoV adaptado a ratón (MA), SARS-CoV-MA15, mediante 15 pases seriados de la cepa Urbani de SARS-CoV en pulmones de ratones BALB/c (Day y col., 2009; Nagata y col., 2008; Roberts y col., 2007). El SARS-CoV-MA15 posee, respecto a la cepa Urbani, 6 mutaciones puntuales en su genoma, localizadas en los genes nsp5 (dos mutaciones), nsp9, nsp13, S y M (Roberts y col., 2007). Las regiones génicas que codifican las proteínas nsp13, S y M también evolucionaron durante la

epidemia incorporando cambios para la adaptación del SARS-CoV a la población humana, lo que sugiere que están implicadas en el tropismo de especie (Chinese Consortium, 2004). El SARS-CoV-MA15 induce en ratones convencionales los principales signos patológicos característicos del ARDS observados en humanos, causando una enfermedad respiratoria aguda y letal más grave en animales de edad avanzada que en animales jóvenes (Roberts y col., 2007). En este trabajo, se ha utilizado como modelo experimental el virus SARS-CoV-MA15 y ratones BALB/c.

#### **2.4. Relevancia de la proteína E en la virulencia del SARS-CoV**

La proteína de la envuelta E se sintetiza abundantemente durante la infección de los CoVs, si bien solo una pequeña fracción se incorpora en la partícula viral (Ruch y Machamer, 2012), lo que sugiere un papel importante en la fase celular del ciclo infectivo viral. La proteína E participa activamente en la morfogénesis del virus, aunque su requerimiento es variable dependiendo de la especie de CoV. En SARS-CoV, la proteína E no es esencial para la producción viral, aunque el virus recombinante sin proteína E (rSARS-CoV-ΔE) se replica con títulos entre 20-200 veces inferiores, dependiendo del tipo celular infectado (DeDiego y col., 2007).

Nuestro grupo ha estudiado extensamente las funciones de la proteína E de SARS-CoV, demostrando que es un factor de virulencia. El virus rSARS-CoV-ΔE está atenuado en varios modelos animales y administrado como vacuna confiere protección frente a la infección con el virus SARS-CoV-MA15 virulento (DeDiego y col., 2007; DeDiego y col., 2008; Fett y col., 2013; Lamirande y col., 2008; Netland y col., 2010). El estudio del mutante rSARS-CoV-ΔE ha permitido identificar funciones y rutas de señalización celulares en las que participa la proteína E, que contribuyen a la virulencia de SARS-CoV. El análisis de la expresión génica diferencial en células infectadas con el virus rSARS-CoV-ΔE, con respecto al virus parental que expresa la proteína E, mostró que en ausencia de proteína E aumentaba la expresión de genes implicados en la respuesta de estrés celular (DeDiego y col., 2011). La delección del gen E también disminuye la expresión de genes de la respuesta pro-inflamatoria inducida por el SARS-CoV, que es la principal responsable de la patología pulmonar, lo que indica que la reducción en la inflamación estaría contribuyendo a la atenuación viral. La respuesta inflamatoria exacerbada asociada a la virulencia de SARS-CoV está regulada principalmente por NF-κB, y la inhibición de esta ruta de señalización con fármacos aumenta la supervivencia de los animales infectados (DeDiego y col., 2014). Nuestro grupo ha identificado dominios funcionales de la proteína E que contribuyen a la patogénesis del virus y ha caracterizado los mecanismos celulares implicados. Para localizar esas regiones se han obtenido por genética reversa virus

con deleciones o mutaciones en el gen E que afectan al dominio amino terminal y a distintas regiones del dominio carboxilo terminal (Regla-Nava y col., 2015). Se ha demostrado que la actividad canal iónico de la proteína E es un factor responsable de la virulencia del SARS-CoV mediante la activación del inflammasoma vía IL-1 $\beta$  (Nieto-Torres y col., 2014). Además, se ha confirmado la relevancia en patogénesis del motivo de unión a dominios PDZ (PBM) localizado en el extremo C-terminal de la proteína E. Los motivos PBM pueden interaccionar potencialmente al menos con 256 dominios PDZ presentes en 145 proteínas celulares, superando las 400 al incluir las distintas isoformas de estas proteínas (Belotti y col., 2013). Estos dominios participan en interacciones proteína-proteína implicadas en una gran variedad de procesos celulares y su desregulación se asocia con alteraciones patológicas de la función celular. En la infección por SARS-CoV, el motivo PBM de la proteína E interacciona con la proteína sintenina, implicada en la activación de la proteína kinasa activada por mitógeno (MAPK), p38-MAPK, y en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias.

### 2.5. Terapias frente a SARS-CoV

Actualmente, no existen terapias frente a la infección por SARS-CoV que hayan sido aprobadas por las agencias reguladoras, aunque sí algunos candidatos a antivirales y vacunas prometedoras. Durante la epidemia del SARS-CoV, el tratamiento de los pacientes infectados por el virus, que en su mayoría presentaban un síndrome respiratorio grave, se limitó a cuidados paliativos. La utilización de IFN de tipo I junto con esteroides, que disminuyen la inflamación, mejoró los niveles de saturación de oxígeno y las lesiones pulmonares (Loutfy y col., 2003). Posteriormente se demostró que el IFN- $\alpha$  pegilado disminuye la replicación del virus en macacos (Haagmans y col., 2004). En nuestro laboratorio se ha determinado que inhibidores de NF- $\kappa$ B (DeDiego y col., 2014) y de p38-MAPK (Jimenez-Guardeño y col., 2014) disminuyen significativamente la inflamación y el edema pulmonar inducido por el SARS-CoV en el modelo de ratón, aumentando la supervivencia.

Muchos de los esfuerzos en la búsqueda de terapias se han centrado en el desarrollo de vacunas eficaces y seguras, incluso en personas de edad avanzada, especialmente susceptibles a la enfermedad causada por el SARS-CoV. Se han probado en modelos animales distintas fórmulas vacunales basadas en virus inactivados, vacunas subunidad de proteínas virales o DNA, vectores virales y virus vivos atenuados, algunas de ellas con buenos resultados (Enjuanes y col., 2008a; Enjuanes y col., 2016; Graham y col., 2013). Sin embargo, con frecuencia, las vacunas subunidad y las basadas en virus inactivados inducen eosinofilia y aumento de la infectividad dependiente de anticuerpos (Tseng y col., 2012). Nuestro grupo generó el

primer candidato vacunal para SARS-CoV utilizando el virus atenuado rSARS-CoV-ΔE. La inmunización con este virus confiere protección en hámsters, ratones transgénicos que sobre-expresan hACE2, y además, en ratones BALB/c de edad avanzada desafiados con el virus virulento adaptado a ratón SARS-CoV-MA15 (Fett y col., 2013; Lamirande y col., 2008; Netland y col., 2010). El candidato vacunal rSARS-CoV-ΔE induce la producción de altos títulos de anticuerpos neutralizantes, así como una respuesta eficiente de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, resultando en una disminución del daño pulmonar, la inflamación, la acumulación de edema y la replicación viral después del desafío con el virus virulento, lo que protege completamente los animales frente a la infección (Fett y col., 2013). Este modelo de vacuna viva atenuada puede ser aplicable al desarrollo de candidatos vacunales para otros CoVs altamente patogénicos como el MERS-CoV (Almazan y col., 2013) o para nuevos virus emergentes. Las vacunas basadas en virus vivos atenuados en general proporcionan una inmunidad más efectiva y duradera, aunque requieran medidas especiales de seguridad para prevenir la reversión a virus virulentos, como la introducción de mutaciones atenuantes adicionales en posiciones distantes del genoma viral (Jimenez-Guardeño y col., 2014).

### **3. RNAs NO CODIFICANTES**

#### **3.1. RNAs celulares no codificantes. Tipos, origen y función.**

Tradicionalmente, los únicos ncRNAs conocidos eran los tRNAs y rRNAs, que participan en la síntesis de las proteínas, y los RNAs nucleares pequeños (snRNAs), que forman parte del complejo de procesamiento de RNAs o *spliceosoma* (Cech y Steitz, 2014). Sin embargo, en los últimos años, a medida que la tecnología ha evolucionado y la sensibilidad de los métodos de secuenciación del genoma ha aumentado, se ha comprobado que por cada gen que codifica una proteína hay cuatro genes que se transcriben y no se traducen (Mercer y col., 2009). De hecho, el 98% del genoma de mamíferos es no codificante y se transcribe para generar ncRNAs (Wilusz y col., 2009). El hecho de que su expresión varíe entre distintos tejidos y momentos del desarrollo indica que los ncRNAs necesariamente están regulados y deben desempeñar una determinada función en los organismos (Ponting y col., 2009). Se ha establecido una relación directa entre la cantidad relativa de secuencias del genoma que dan lugar a ncRNAs y la complejidad de un organismo (Taft y col., 2007). Esta observación sugiere que en los organismos más complejos la evolución ha conducido a sistemas sofisticados para regular de forma muy precisa la diversidad en la expresión génica durante la ontogenia multicelular, así como en una gran variedad de procesos celulares (Cech y Steitz, 2014). El creciente conocimiento de la función de

los ncRNAs ha desterrado la idea inicial de que estos RNAs eran solo ruido transcripcional.

Los ncRNAs de mayor tamaño (más de 200 nt) se denominan ncRNAs largos (lncRNAs), se localizan tanto en el núcleo como en el citoplasma (Atkinson y col., 2012) y tienen funciones reguladoras de la expresión génica tanto en la transcripción como postranscripcionalmente (Mercer y col., 2009). Los lncRNAs actúan como reguladores transcripcionales por distintos mecanismos: 1. Regulación epigenética por asociación con enzimas de remodelación de la cromatina; 2. Unión directa a promotores de genes y reclutamiento de proteínas de unión a RNA que activan o reprimen la expresión del gen; 3. Como cofactores que se unen a factores de transcripción; 4. Por interacción con la RNA polimerasa II, lo que tiene un efecto generalizado en transcripción. Los lncRNAs también contribuyen a la regulación epigenética de la expresión génica postranscripcionalmente, como lncRNAs antisentido que se unen a secuencias complementarias de intrones o mRNAs y modulan el procesamiento, la traducción o la estabilidad de mRNAs (Geisler y Collier, 2013; Mercer y col., 2009).

Los ncRNAs de menor tamaño (menos de 200 nt) denominados ncRNAs pequeños (sncRNAs) conforman un extenso y diverso sistema de regulación en las células de organismos multicelulares desde los más primitivos, como las esponjas, hasta los más evolucionados, como los mamíferos (Taft y col., 2010). Existen muchas clases de sncRNAs que intervienen en la regulación postranscripcional de la expresión génica por distintos mecanismos. Los RNAs endógenos interferentes pequeños (siRNAs) derivan de RNAs virales de doble cadena que se procesan en fragmentos de 21-24 nt y se unen a secuencias complementarias de RNAs diana modulando su silenciamiento por nucleasas de la familia Argonauta (Ago) (Aliyari y Ding, 2009). Este sistema de defensa antiviral (RNAi) es característico de plantas, artrópodos y nematodos (Zamore y Haley, 2005). Aunque los cordados, que incluyen a los vertebrados, conservan la maquinaria de interferencia RNAi, han evolucionado hasta adquirir un sistema antiviral mediado por proteínas y denominado sistema de IFN tipo I (Benitez y col., 2015; tenOever, 2016).

Los RNAs que interaccionan con PIWI (piRNAs) silencian elementos transposones en la línea germinal de mamíferos (Sarkar y col., 2017). Los RNAs pequeños asociados a promotores (PASR) y RNAs de inicio de transcripción regulan la transcripción génica (Taft y col., 2010). Los RNAs pequeños nucleolares (snoRNAs) forman complejos de ribonucleoproteínas y guían las modificaciones postranscripcionales del rRNA. Además, pueden procesarse generando RNAs derivados de snoRNAs (sdRNAs) con diversas funciones, incluyendo la represión de la



traducción de forma similar a microRNAs (miRNAs) (Mleczko y Bakowska-Zywicka, 2016). Los RNAs pequeños más estudiados son los miRNAs, que comprenden una de las clases más abundantes de moléculas reguladoras de la expresión génica en organismos multicelulares, que se describen a continuación.

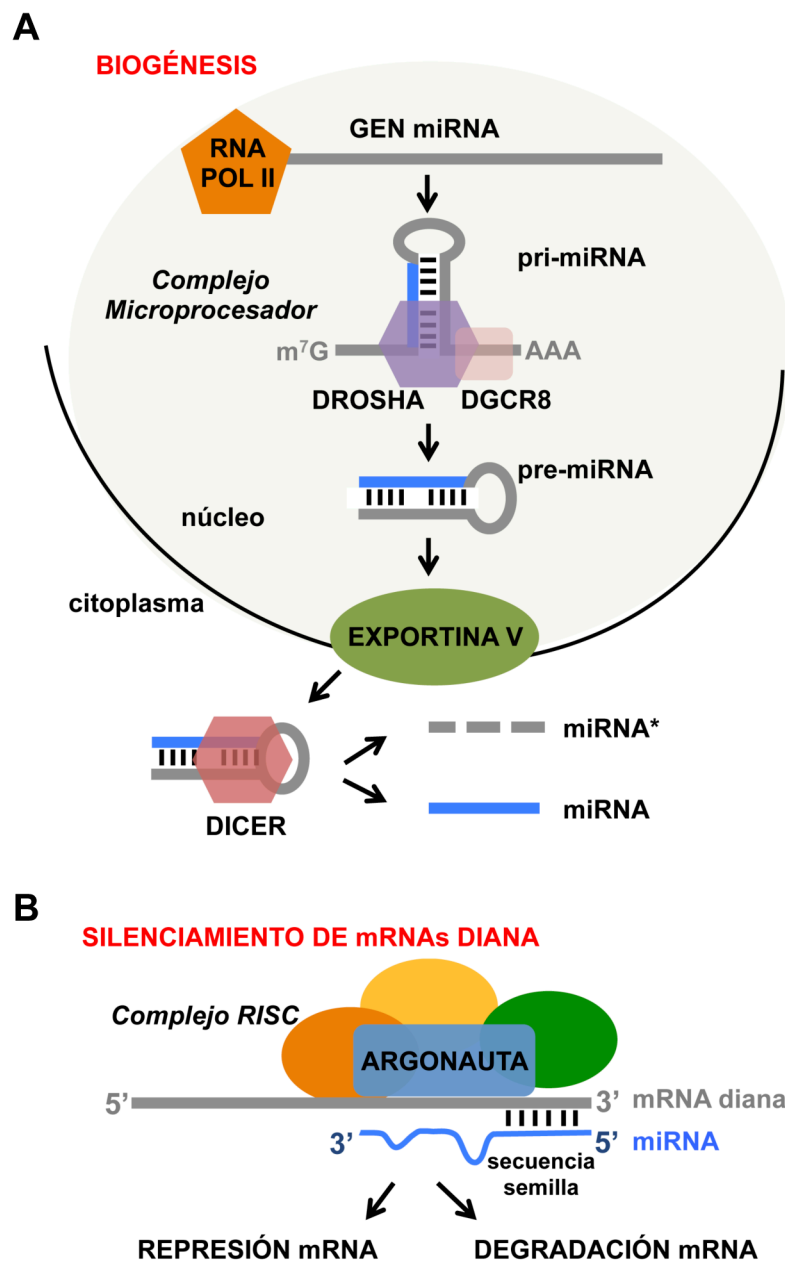
### 3.2. miRNAs

Los miRNAs son RNAs endógenos no codificantes de 21-25 nt que actúan como reguladores postranscripcionales de la expresión génica (Fig. 3) y se han detectado en distintos organismos incluyendo plantas, moscas, gusanos, animales superiores y virus (Bushati y Cohen, 2007) (Bartel, 2004). El primer miRNA descrito, *lin-4*, se descubrió en el invertebrado *C. elegans* y regulaba la transición entre las fases del desarrollo larvario al unirse a secuencias complementarias del mRNA *lin-14* reprimiendo su traducción (Lee y col., 1993). Desde entonces, el número de miRNAs descubiertos en distintos organismos y su multiplicidad de funciones no ha dejado de crecer. Los miRNAs controlan procesos biológicos tan variados como el desarrollo de hojas y flores en plantas, la proliferación y muerte celular en moscas, el patrón neuronal en nematodos o la diferenciación del linaje hematopoyético en mamíferos (Bartel, 2004).

#### 3.2.1. Biogénesis de los miRNAs

Los miRNAs se expresan a partir de distintas regiones del genoma que incluyen: (i) regiones intergénicas distantes de genes, por lo que se expresan en unidades transcripcionales independientes; (ii) intrones, denominados mirtrones, que permiten la expresión coordinada a partir del mismo RNA del miRNA y el mRNA regulado (Kim y Kim, 2007; Sibley y col., 2012). El procesamiento por el *spliceosoma* genera un lazo que deriva en el precursor del miRNA, por lo que no se requiere la acción del enzima Drosha. Aproximadamente el 75% de los miRNAs proceden de regiones intergénicas. Su biogénesis comienza con la transcripción por la RNA polimerasa II del miRNA primario (pri-miRNA), un RNA de varios cientos de nt de longitud que contiene una estructura de doble cadena (dsRNA), formando una horquilla (Fig. 3). Esta estructura de dsRNA es reconocida en el núcleo por el complejo microprocesador, que incluye el enzima RNasa III Drosha. Esta endonucleasa corta el RNA a ambos lados de la horquilla para liberar el precursor del miRNA (pre-miRNA) (Bushati y Cohen, 2007), de unos 60-70 nt. El pre-miRNA tiene una estructura en horquilla, con un tallo en el que hibridan dos cadenas de RNA de unos 22 nt parcialmente complementarios, separados por un lazo (Kozomara y Griffiths-Jones, 2011). La Exportina V transloca el pre-miRNA al citoplasma, donde es procesado por la enzima RNasa III Dicer, que

separa el lazo del dúplex imperfecto, liberando los dos miRNAs denominados brazo 5p y brazo 3p, de unos 22 nt cada uno. Potencialmente, ambos miRNAs son funcionales (Pink y col., 2015). Sin embargo, habitualmente es uno de ellos el que se encuentra en la célula en niveles significativamente más altos, indicando que es más estable y podría tener más relevancia funcional. Este miRNA se denomina miRNA maduro, mientras que el miRNA parcialmente complementario se denomina pasajero o miRNA\*. Aunque el miRNA maduro es el que más frecuentemente realiza la función, también se han encontrado algunos miRNAs pasajeros funcionales (Mah y col., 2010).



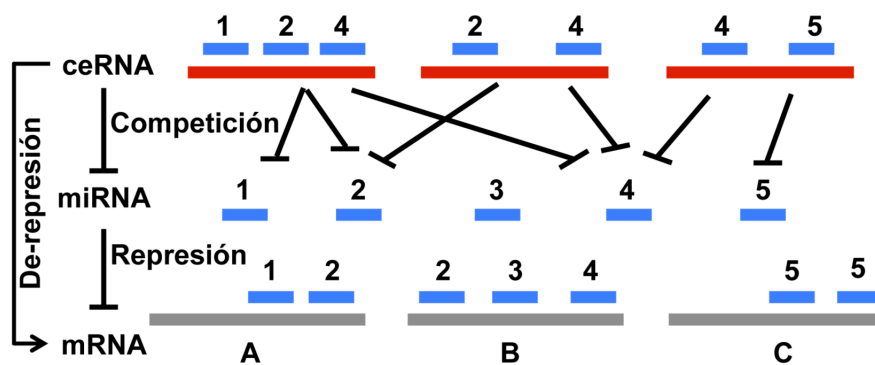
**Figura 3. Ruta canónica de biogénesis de miRNAs celulares y silenciamiento postranscripcional de la expresión génica.** (A) La RNA polimerasa II transcribe los genes de miRNAs celulares, generando los

miRNAs primarios (pri-miRNA). Los pri-miRNAs tienen en su extremo 5' la estructura Cap y en el extremo 3' una cola poliA y son procesados por el complejo microprocesador, formado por la RNasa III DROSHA y otras proteínas como DGCR8, que libera los precursores de miRNAs (pre-miRNA). Los precursores tienen una estructura característica en horquilla formada por una pareja de miRNAs que hibridan parcialmente y son transportados al citoplasma por la Exportina V. En el citoplasma, los precursores son procesados por la RNasa III DICER, que libera el dúplex del miRNA, formado por el miRNA maduro y el miRNA pasajero (\*), que puede ser degradado. (B) El miRNA maduro se incorpora al complejo de inducción del silenciamiento mediado por miRNAs (RISC) formado por un conjunto de proteínas que incluye proteínas argonauta con actividad RNasa. En el complejo RISC, el miRNA interacciona con su mRNA diana a través de la secuencia semilla (nt 2-7). Como consecuencia, el mRNA se silencia traduccionalmente, bien porque se reprime su traducción o porque se degrada, dependiendo del grado de complementariedad entre miRNA y mRNA diana.

### 3.2.2. Mecanismo de acción de miRNAs

El miRNA funcional se asocia a la proteína Argonauta 2 (Ago2) para formar parte del complejo de silenciamiento inducido por RNAs (RISC). El miRNA guía al complejo RISC en la interacción con el mRNA diana, mediada por la complementariedad entre la secuencia semilla del miRNA (nt 2-7) y secuencias del mRNA diana que suelen localizarse en su extremo 3' UTR (Bartel, 2009), aunque también pueden encontrarse en el extremo 5' UTR y en la propia secuencia codificante. Además de la interacción con la secuencia semilla canónica, comprendida entre los nt 2-7 del miRNA, se ha descrito la relevancia de los nt flanqueantes 1 y 8, e incluso de apareamientos compensatorios entre el extremo 3' del miRNA y el mRNA diana. Como consecuencia de la interacción entre el miRNA y su mRNA diana en el complejo RISC, se produce el silenciamiento de la expresión del mRNA por dos posibles mecanismos (Fig. 3): (i) Si la complementariedad entre el miRNA y el mRNA es perfecta, Ago2 corta endonucleolíticamente el mRNA, produciendo su degradación directamente; (ii) Si la complementariedad es imperfecta, como ocurre en la mayoría de los casos en las células animales, el mRNA se reprime traduccionalmente mediante su desestabilización por acortamiento del poliA en el extremo 3' y pérdida de su estructura cap en el 5' (Bushati y Cohen, 2007). En cualquier caso, la síntesis de las proteínas a partir del mRNA diana se reprime entre 1,2 y 4 veces, por lo que los miRNAs se denominan reguladores finos de la expresión génica (O'Connell y col., 2012). Un mismo miRNA puede tener varios mRNAs diana y viceversa, un mismo mRNA puede estar regulado por varios miRNAs (Chi y col., 2009), que generalmente forman parte de la misma familia de miRNAs, conformando redes de regulación complejas en las que se combinan pequeños efectos de varios miRNAs sobre muchos mRNAs (Fig. 4). En mamíferos, al menos el 30% de los mRNAs que codifican proteínas están regulados por miRNAs. Estas proteínas intervienen en prácticamente cualquier proceso celular fisiológico o patológico (Peter, 2010). La complejidad de la red regulatoria mediada por miRNAs aumenta si sumamos que los miRNAs pueden

ser secuestrados, a modo de esponja, por RNAs endógenos competidores (ceRNAs) para evitar su función represora (Ala y col., 2013). Estos ceRNAs pueden ser otros mRNAs, lncRNAs, RNAs circulares o RNAs de pseudogenes. La complejidad de las interacciones mRNA-miRNA y la variabilidad en los perfiles de expresión de mRNAs y miRNAs en distintos tipos celulares y estados del organismo implican que la función de un determinado miRNA es altamente dependiente del tejido y del contexto de mRNAs y miRNAs en un momento dado (Lee y col., 2008). Por tanto, para obtener resultados con relevancia biológica es fundamental trabajar en el sistema más natural posible (Grundhoff y Sullivan, 2011).



**Figura 4. La regulación mediada por miRNAs conforma una compleja red de interacciones.** Un miRNA (líneas azules indicadas con números) puede regular postranscripcionalmente un único mRNA diana (líneas grises nombradas con letras) (miRNA 1-mRNA A), aunque lo más habitual es que pueda reprimir dos o más mRNAs dianas que suelen participar en una misma ruta celular. Del mismo modo, un mRNA puede estar silenciado por un solo miRNA (mRNA C regulado por miRNA 5) que en ocasiones tiene varios sitios de unión para el miRNA. Sin embargo, lo más común es que sean varios miRNAs los que regulen a un mismo mRNA. Además, las interacciones miRNA-mRNA, dependen de otros RNAs no codificantes que actúan como esponjas o competidores endógenos (ceRNAs), compitiendo con la unión de los miRNAs a sus respectivas dianas, y en consecuencia, de-reprimiéndolas. La expresión de un mRNA en un momento y tejido determinados va a depender de la expresión de múltiples miRNAs y otros RNAs no codificantes.

### 3.2.3. Funciones de los miRNAs

Las funciones de los miRNAs se han estudiado mayoritariamente en el campo del cáncer y la diferenciación celular, donde los miRNAs han demostrado jugar papeles clave (Schickel y col., 2008). Se han descrito miRNAs que cambian su expresión en procesos tumorales (oncomiRNAs) y circulan en sangre, por lo que pueden usarse como marcadores de la enfermedad (Bertoli y col., 2015). Además, los miRNAs regulan la traducción de numerosos genes de la respuesta inmune (O'Connell y col., 2012), promoviendo el proceso inflamatorio, como el miR-155, o inhibiéndolo, como los miR-146a y -21. De hecho, la infección del virus de la estomatitis vesicular (VSV), a través del mediador proinflamatorio NF-kB, induce en macrófagos la expresión del miR-146a, que regula negativamente la respuesta inflamatoria disminuyendo la

expresión de sus mRNAs diana TRAF6, IRAK1 e IRAK2 (Hou y col., 2009). La predicción bioinformática de dianas de miRNAs reveló que los mRNAs relacionados con la inmunidad innata que acumulaban más dianas eran factores de transcripción, cofactores y modificadores de cromatina, mientras que los receptores TLR, y moléculas efectoras como quimioquinas y citoquinas tenían menos dianas (Asirvatham y col., 2009). Este hecho refuerza la idea de los miRNAs como un nivel adicional de regulación, cuya acción se ejerce sobre otros reguladores para modular de forma precisa y sutil los procesos celulares. Por el contrario, la regulación de moléculas efectoras requeriría cambios mayores en los niveles de expresión. Los miRNAs también participan en la respuesta a situaciones de estrés, en particular infecciones virales. El virus *Epstein Barr* (EBV), promueve en células B infectadas la expresión de miRNAs celulares que predisponen a la transformación tumoral de las células e inhiben la respuesta de IFN (O'Connell y col., 2012). La infección de células humanas por el virus Sendai aumenta los niveles de IFN, que induce la expresión del miR-203, cuya diana es ISG56 (Buggele y Horvath, 2013), que regula la intensidad y duración de la respuesta mediada por IFN. Recientemente se ha descrito que los miRNAs regulan la respuesta inflamatoria mediada por citoquinas durante la infección viral (Aguado y col., 2015). En otros casos, la presencia de un miRNA puede ser determinante para la infección viral, bien como un factor restrictivo o imprescindible. Así, la infección por el enterovirus (EV) EV71 induce la expresión del miR-296-5p, cuya diana es el genoma viral, por lo que inhibe su replicación, actuando como antiviral (Ho y col., 2016). Por el contrario, la replicación del virus de la hepatitis C (HCV) depende del miR-122 celular expresado abundantemente en células hepáticas. Este miR-122 se une a secuencias virales del extremo 5' y aumenta la estabilidad del RNA genómico (Luna y col., 2015). La administración de ácidos nucleicos de secuencia complementaria al miRNA-122 redujo los títulos virales y la expresión de genes regulados por IFN en chimpancés, convirtiéndose en una terapia antiviral alternativa prometedora (Janssen y col., 2013). La contribución de los miRNAs a la respuesta del hospedador a la infección del SARS-CoV se estudió por primera vez en células madre bronquioalveolares (BASCs), en las que los miRNAs miR-17\*, miR-574-5p y miR-214 estaban sobre-expresados en la infección. Estos miRNAs tenían dianas potenciales en los genes virales ORF1a, S, E, M y N, aunque su función en la infección no se confirmó experimentalmente (Mallick y col., 2009). Posteriormente, en un ambicioso experimento *in vivo* con distintas cepas de ratones, se analizaron los sncRNAs diferencialmente expresados en la infección con SARS-CoV o con cepas del virus de la gripe de diferente patogenicidad. Se encontraron 46 miRNAs cuya expresión variaba de distinta forma en respuesta a las infecciones virales, si bien su

relevancia específica no se determinó (Peng y col., 2011). De acuerdo con estos resultados, la infección del SARS-CoV se asocia a cambios en la expresión de miRNAs en el pulmón de los ratones infectados, como parte de la respuesta celular a la infección.

### 3.2.4. Identificación de dianas de miRNAs

Para determinar la función de un miRNA es necesario descubrir cuál o cuáles son sus mRNAs diana. La búsqueda de estas dianas es compleja y actualmente se emplean dos aproximaciones: 1. Predicción bioinformática; 2. Experimentos funcionales de inmunoprecipitación (IP) del complejo RISC para identificar los mRNAs asociados a un miRNA. Se han desarrollado muchos programas informáticos que realizan búsquedas de mRNAs dianas a partir de un miRNA ya anotado en la base de datos (Riffo-Campos y col., 2016). Sin embargo, no es posible hacerlo a partir de un miRNA de secuencia conocida, pero todavía no anotada. Todos estos programas basan la búsqueda de dianas en dos parámetros relacionados: la complementariedad entre la secuencia semilla del miRNA y el mRNA, y la energía libre de la interacción entre ambas moléculas. Al ser interacciones de pocos nt (6-8 nt), el resultado de la búsqueda de mRNAs diana potenciales suele ser un número muy elevado, de cientos o miles, de mRNAs, muchos de ellos posiblemente correspondientes a ruido inespecífico, lo que imposibilita su validación funcional. Para establecer filtros efectivos a las múltiples dianas potenciales, es necesario disponer de información adicional, como por ejemplo conocer la ruta que podría estar regulando el miRNA. Alternativamente, pueden cruzarse los datos de expresión de miRNAs con los de mRNAs para identificar qué mRNAs disminuyen al aumentar los niveles de miRNA, o viceversa. Sin embargo, esta opción no sería útil cuando la regulación por miRNAs no implica degradación y, por tanto, no disminuyen los niveles del mRNA diana (Fabian y Sonenberg, 2012). Recientemente, se han incorporado nuevas tecnologías de alto rendimiento (*high-throughput*) para la identificación de dianas de miRNAs, que consisten en la inmunoprecipitación del complejo RISC con los miRNAs unidos covalentemente a sus mRNAs diana y posteriormente, la secuenciación masiva de RNAs (Luna y col., 2015; Scheel y col., 2016).

Para los miRNAs más estudiados hay disponibles bases de datos como *miRTarBase*, que agrupan las dianas de miRNAs ya validadas y publicadas en la literatura. Sin embargo, estos miRNAs todavía representan un número pequeño en relación con todos los conocidos y muchas veces el método de validación empleado es poco convincente. En resumen, validar la función de un miRNA con los

conocimientos y las técnicas actuales sigue siendo un gran reto en el campo del conocimiento de los miRNAs.

### 3.3. RNAs virales no codificantes

Los ncRNAs no solo se originan en la vida celular, sino también a partir de genomas virales. Muchos virus sintetizan sus propios ncRNAs, que desempeñan funciones importantes en la regulación del propio ciclo viral o en la interacción con el hospedador (Tycowski y col., 2015). De hecho, el uso de moléculas de ncRNAs en lugar de proteínas para ejercer una determinada función puede ser beneficioso para los virus desde el punto de vista de la evasión del sistema inmune, al ser moléculas menos inmunogénicas. Además, dado que los genomas virales tienen un tamaño limitado, disponer de moléculas pequeñas con capacidad reguladora puede ser ventajoso para los virus.

#### 3.3.1. Expresión de ncRNAs en virus de genoma DNA

Los primeros ncRNAs virales descritos eran productos de la transcripción del genoma de virus DNA de la familia de los adenovirus (Mathews y Shenk, 1991). Estos ncRNAs se denominaron RNAs asociados a virus (VA RNAs), tenían un tamaño de unos 160 nt y se expresaban muy abundantemente en las células infectadas ( $10^7$  copias por célula). Posteriormente, los avances tecnológicos han permitido asignar funciones a algunos de estos ncRNAs. El VA RNA I interacciona con la proteína quinasa R (PKR) e inhibe su activación como represor de la traducción en la respuesta antiviral, permitiendo que se sinteticen las proteínas virales. Los VA RNAs I y II pueden actuar como sustratos del enzima de procesamiento de miRNAs Dicer, saturando el complejo de silenciamiento RISC y evitando la acción de los miRNAs celulares sobre sus dianas (Tycowski y col., 2015).

Otros virus DNA, los herpesvirus, también sintetizan varios tipos de ncRNAs con distintos tamaños y funciones, ampliamente estudiados. El virus EBV codifica dos ncRNAs llamados EBER 1 y EBER 2, de unos 170 nt, que se expresan muy abundantemente en células infectadas ( $10^6$  copias por célula). EBER 1 y 2 se localizan en el núcleo de la célula e inducen la expresión de las citoquinas IL-9 y 10 específicamente en linfocitos B (Kitagawa y col., 2000; Yang y col., 2004), así como de la proteína antiapoptótica Bcl-2 por mecanismos aún desconocidos (Komano y col., 1999). Además, EBER 2 se une por interacciones RNA-RNA a las secuencias repetidas terminales del genoma viral y estabiliza la unión de un factor de transcripción responsable de la expresión de genes de latencia del virus. El *Herpesvirus saimiri* (HVS) expresa varios ncRNAs denominados HSURs, de unos 100-150 nt, en niveles

del orden de  $10^3$  copias por célula infectada. Los HSURs 1 y 2 actúan como RNAs endógenos competitivos, uniéndose a miRNAs celulares como miR-27, miR-16 o miR-142-3p para secuestrarlos y evitar su función en la célula (Cazalla y col., 2010).

Además de los ncRNAs con tamaños mayores de 100 nt, numerosos virus DNA, como los herpesvirus, también transcriben ncRNAs de menor tamaño (22-25 nt), los miRNAs virales, que se generan a partir de precursores del genoma viral similares a los de los miRNAs celulares. Al igual que los miRNAs celulares, los miRNAs virales se unen a través de su secuencia semilla a secuencias complementarias en mRNAs diana para silenciar su expresión (Riley y col., 2010). Entre las funciones más importantes de los miRNAs de herpesvirus están la regulación de sus ciclos lítico y de latencia y la respuesta del hospedador a la infección (Boss y Renne, 2010; Cox y Sullivan, 2014). El herpesvirus causante del sarcoma de Kaposi (KSHV) codifica el miR-K12-9\*, que tiene como diana el mRNA de un activador de la transcripción viral, para impedir la salida de la latencia y la transición al estado lítico de la infección (Bellare y Ganem, 2009).

Otros miRNAs virales regulan la persistencia al silenciar mRNAs diana celulares implicados en la respuesta inmune innata. Así, el miR-K12-5 de KSHV reprime el mRNA de MYD88, que interviene en la señalización por TLRs y lleva a la activación de NF- $\kappa$ B, de forma que su represión por miR-K12-5 disminuye la expresión de citoquinas proinflamatorias (Abend y col., 2012). Por otra parte, el miR-K1 promueve la activación de la señalización de NF- $\kappa$ B a través del silenciamiento de su represor I $\kappa$ B, lo que suprime la replicación lítica viral de KSHV (Lei y col., 2010).

### 3.3.2. Expresión de ncRNAs en virus de genoma RNA

Hasta hace poco tiempo ha existido controversia acerca de la existencia de ncRNAs codificados por virus RNA en células de mamífero. Sin embargo, el aumento en la sensibilidad de las técnicas de detección como la secuenciación masiva ha proporcionado evidencia de que los virus RNA también expresan RNAs no codificantes.

Una de las objeciones teóricas a la existencia de estos ncRNAs en virus RNA citoplasmáticos es el requerimiento de enzimas nucleares como Drosha para su procesamiento. Sin embargo, se ha demostrado que la infección viral induce la relocalización de Drosha desde el núcleo al citoplasma, donde actúa en el procesamiento de miRNAs a partir del genoma viral (Shapiro y col., 2012). Además, se ha confirmado que algunos virus RNA citoplasmáticos han desarrollado estrategias alternativas a la vía celular canónica para la biogénesis de sus ncRNAs, prescindiendo de la etapa nuclear. Se ha demostrado que el virus citoplasmático Sindbis puede



producir un miRNA artificial a partir de un pri-miRNA expresado como RNA subgenómico de forma dependiente del enzima citoplasmático Dicer, pero independientemente de Drosha (Shapiro y col., 2010). Además, el virus de la Hepatitis A (HAV) genera sus propios miRNAs, denominados hav-miR1-5p y hav-miR2-5p, a partir de una secuencia precursora pre-miRNA codificada en el genoma del virus y procesada por el enzima Dicer. Estos miRNAs maduros son capaces de silenciar un mRNA marcador con secuencias diana, aunque se desconoce su función en la infección (Shi y col., 2014). El enterovirus EV71 codifica un ncRNA pequeño, también denominado RNA pequeño viral (svRNA), que se genera en células infectadas por la actividad de Dicer. Este svRNA regula negativamente la traducción en el ciclo viral mediante su unión al 5' UTR del genoma viral, lo que bloquea el sitio interno de entrada del ribosoma (IRES) (Weng y col., 2014). En el virus de la gripe se han descrito svRNAs generados por la propia RNA polimerasa viral con independencia de Dicer, que interaccionan con la maquinaria de síntesis de RNA viral y regulan el paso de transcripción a replicación (Perez y col., 2010). Por otro lado, los virus HCV, Polio, Dengue, de la Estomatitis Vesicular y del Nilo Occidental (WNV) también generan svRNAs en un gran repertorio de hospedadores, aunque no se ha profundizado en su estudio funcional (Parameswaran y col., 2010). En flavivirus, se han descrito ncRNAs pequeños de flavivirus (sfRNAs), generados por la acción sobre el genoma viral de la exorribonucleasa celular XRN1 que degrada parcialmente el RNA desde el 5' hasta detenerse en estructuras secundarias complejas del extremo 3' UTR. Estos sfRNAs contribuyen a la patogénesis de flavivirus a través de varios mecanismos de interferencia con la respuesta antiviral del hospedador. La generación de los sfRNAs del virus WNV resulta en inhibición de XRN1, implicada en la degradación de mRNAs celulares en cuerpos de procesamiento (*p-bodies*), lo que interfiere con el recambio de mRNAs y con la regulación postranscripcional de la expresión génica en la célula (Roby y col., 2014). Otros sfRNAs del WNV evitan la acción antiviral del IFN al unirse a proteínas celulares (G3BP1, G3BP2 y CAPRIN1) que regulan la expresión de los mRNAs de genes estimulados por IFN (Bidet y col., 2014). Otro mecanismo de acción descrito para sfRNAs de WNV es inhibir la vía de interferencia RNAi en insectos actuando como sustratos e inhibidores competitivos de Dicer (Schnettler y col., 2012). La evidencia creciente de la existencia de ncRNAs derivados de virus RNA citoplasmáticos ha estimulado la búsqueda de estos RNAs en otros virus RNA citoplasmáticos como los CoVs, en los que podrían regular bien el propio ciclo viral o la respuesta antiviral del hospedador.



## **OBJETIVOS**

---



El objetivo de esta tesis es estudiar la relevancia de los RNAs no codificantes (ncRNAs) de pequeño tamaño, tanto los miRNAs celulares como ncRNAs derivados del genoma viral en la patología pulmonar causada por SARS-CoV. Para ello, se ha utilizado un modelo *in vivo* de infección con el virus adaptado a ratón SARS-CoV-MA15-wt o el mutante atenuado SARS-CoV-MA15-ΔE en el que el gen de virulencia de la proteína E se había deletado.

Los objetivos específicos abordados en este trabajo son:

1. Identificar por secuenciación masiva miRNAs celulares diferencialmente expresados en los pulmones de ratones infectados con el SARS-CoV atenuado o el virulento y determinar su posible función reguladora de la patología inflamatoria asociada a la presencia de la proteína E.
2. Identificar por secuenciación masiva RNAs no codificantes generados a partir del genoma de SARS-CoV (svRNAs) en la infección *in vivo*. Estudiar la presencia de svRNAs en la infección de células en cultivo.
3. Estudiar la biogénesis de los RNAs no codificantes derivados del genoma de SARS-CoV.
4. Estudiar la capacidad de los svRNAs derivados de SARS-CoV de silenciar la expresión de mRNAs diana.
5. Estudiar la relevancia de los svRNAs en el crecimiento viral y en la patología pulmonar inflamatoria causada por SARS-CoV.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**

---





## **1. CÉLULAS EUCARIOTAS**

### **1.1. Líneas celulares**

Las células Vero E6 derivadas de riñón de mono verde africano, fueron cedidas por el Dr. Eric Snijder (EMC, Universidad de Leiden, Holanda). Las células DBT derivadas de astrocitoma de ratón, fueron cedidas por el Dr. Thomas Gallagher (Universidad de Loyola, Chicago, USA). La línea celular derivada de la anterior que expresa establemente el receptor para el SARS-CoV en ratón, DBT-mACE2, fue generada en nuestro laboratorio (Regla-Nava y col., 2013). La línea celular Calu-3 2B4, derivada de células epiteliales de bronquio humano que expresan establemente el receptor ACE2 y son susceptibles a la infección por SARS-CoV (Yoshikawa y col., 2010), fue cedida por el Dr. Kent Tseng (Universidad de Texas, USA). Las células 293T noDicer, deficientes en la RNasa III Dicer, y 293T RNasa III  $-/-$ , deficientes en Dicer y Drosha, fueron cedidas por el Dr. Benjamin tenOever (Monte Sinai, USA). La línea celular Madin-Darby de riñón canino, MDCK (Meguro y col., 1979), se utilizó para estudiar el procesamiento de miRNAs. La línea celular ST (McClurkin y Norman, 1966), derivada de testículo embrionario de cerdo fue cedida al laboratorio por el Dr. L. Kemeney (National Animal Disease Center, Ames, Iowa, EE.UU.).

### **1.2. Cultivo de líneas celulares eucariotas**

Las líneas celulares Vero E6, DBT-mACE2, Calu-3 2B4, 293T, MDCK y ST se cultivaron a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% con una humedad del 98%, en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco) suplementado con 25 mM HEPES, 100 UI/ml de penicilina (Sigma-Aldrich), 100 µg/ml de estreptomicina (Sigma-Aldrich), 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich), aminoácidos no esenciales al 1% (Sigma-Aldrich) y suero fetal bovino (FBS) al 10%, excepto las células Calu-3 2B4 que se cultivaron con FBS al 20%. Para mantener la selección de las células DBT-mACE2 transformadas establemente con el gen del receptor murino del virus SARS-CoV, se cultivaron en presencia de genética (G418) (Sigma-Aldrich), a una concentración final de 0,8 mg/ml en el medio de cultivo. Todas las líneas celulares se almacenaron congeladas en nitrógeno líquido a una densidad de  $1-2 \times 10^6$  células/ml en dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich) al 10% en FBS.

## **2. VIRUS**

### **2.1. Aislados virales**

El trabajo con virus infeccioso SARS-CoV en ratones se realizó en las instalaciones de bioseguridad del CISA-INIA y fue aprobado por el Ministerio de Medio Ambiente (resolución 001/36438). La manipulación del virus en cultivos celulares se realizó en

un laboratorio de bioseguridad con nivel de contención 3 (CNB, CSIC). El laboratorio está equipado con los medios e infraestructuras necesarias para la contención del virus SARS-CoV, que se transmite por el aire, incluyendo un sistema de tratamiento de aire y de inactivación biológica de efluentes líquidos. Además, el operador está permanentemente protegido con un sistema de filtración de aire *HEPA Airmate* (3M) y la vestimenta adecuada, compuesta por monos y calzas de protección (Tyvek) y varios pares de guantes.

Los virus recombinantes SARS-CoV adaptados a ratón de secuencia silvestre (rSARS-CoV-MA15), el mutante de delección carente del gen E (rSARS-CoV-MA15-ΔE) (DeDiego y col., 2007), y el mutante del gen E sin actividad canal iónico (rSARS-CoV-MA15-E-N15A) (Nieto-Torres y col., 2014), utilizados en los experimentos de esta tesis, se generaron y rescataron previamente en nuestro laboratorio incluyendo en el cDNA de longitud completa (Almazan y col., 2006) las mutaciones descritas por Roberts y col en 2007.

El aislado del TGEV PUR46-MAD (código de acceso *GenBank* AJ271965) corresponde al clon PUR46-CC120-MAD aislado en nuestro laboratorio, que deriva del aislado Purdue del TGEV, obtenido en el año 1946 en Indiana (EE.UU.) por Doyle y Hutchings (Penzes y col., 2001; Sanchez y col., 1990).

### **2.2. Crecimiento y titulación de virus en cultivos celulares**

Para titular el SARS-CoV por el método de formación de placas de lisis en medio semi-sólido, se utilizaron monocapas confluentes de células Vero E6 crecidas en placas de 12 pocillos. Los virus se adsorbieron durante 45 minutos a 37°C. Se retiró el medio de adsorción y se añadió medio DMEM suplementado con 2% de FBS y agarosa al 0,6%. A las 72 horas después de la infección (hdi), las células se fijaron con formaldehído (Sigma-Aldrich) al 10% en tampón fosfato salino (PBS) (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7,4) durante 30 minutos a temperatura ambiente y las placas de lisis se visualizaron mediante tinción con cristal violeta. El límite de sensibilidad de la técnica fue de 20 unidades formadoras de placa (ufp) por ml.

## **3. BACTERIAS**

### **3.1. Cepas y cultivos de bacterias**

La cepa DH10B de *E. coli* (Gibco), cuyo genotipo es F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Ø80dlacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK l-rpsL nupG, se utilizó rutinariamente para la clonación y amplificación de plásmidos.

Los cultivos bacterianos se realizaron en medio líquido Luria-Bertani (LB) (Sambrook y Russell, 2001) a 37°C. El medio sólido se preparó añadiendo agar al LB a una concentración de 15 g/l y se utilizó para el aislamiento de colonias bacterianas. El medio se suplementó con los antibióticos adecuados [150 µg/ml de ampicilina (Sigma-Aldrich) o 10 µg/ml de kanamicina (Sigma-Aldrich), según se indica] cuando fue necesario.

### **3.2. Generación de bacterias competentes**

Las bacterias DH10B competentes para electroporación se prepararon partiendo de una colonia única crecida en medio sólido, que se inoculó en dos litros de medio *Super Optimal Broth* (SOB) [20 g/l triptona (*Becton, Dickinson and Company*), 5 g/l extracto de levadura (*Becton, Dickinson and Company*), 0,5 g/l NaCl (Sigma-Aldrich), 0,18 g/l KCl (Sigma-Aldrich)] y se creció a 37°C hasta alcanzar una absorbancia de 0,7 a una longitud de onda de 550 nm ( $A_{550}$ ). A continuación, el cultivo se enfrió a 4°C durante 20 min, las bacterias se sedimentaron por centrifugación a 4000xg durante 15 min, y se lavaron cuatro veces con una solución de glicerol al 10% a 4°C, utilizando un volumen equivalente al del cultivo inicial en el primer lavado, que se fue reduciendo a la mitad en los sucesivos lavados (2 l, 1 l, 0,5 l, y finalmente 0,25 l). En cada lavado las bacterias se resuspendieron a 4°C y se sedimentaron a 4000xg durante 15 min. El sedimento final se resuspendió en 6 ml de glicerol al 10% a 4°C y se repartió en alícuotas que se congelaron a -80°C hasta su utilización.

### **3.3. Transformación de bacterias**

Las bacterias DH10B competentes se transformaron mediante electroporación mezclando el DNA de interés con 50 µl de bacterias competentes. La mezcla DNA-bacterias competentes se transfirió a una cubeta de electroporación de 0,2 cm (Bio-Rad) donde se aplicó un pulso eléctrico de 25 µF, 2,5 KV y 200 Ω utilizando un electroporador *GenePulser* (Bio-Rad). Inmediatamente, las bacterias se resuspendieron en 1 ml de medio LB, se incubaron a 37°C con agitación durante 45 min y se sembraron por extensión en superficie sobre placas de medio LB-agar con el antibiótico de selección adecuado.

## **4. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DEL DNA**

### **4.1. Manipulación y purificación de plásmidos**

Para la purificación de los plásmidos a partir de cultivos bacterianos a pequeña o mediana escala se utilizaron los reactivos *Plasmid Mini Kit* o *Plasmid Midi Kit* (QIAGEN), respectivamente, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los cultivos

bacterianos se crecieron a 37°C durante 18 h aproximadamente en medio LB suplementado bien con 20 µg/ml de ampicilina (Sigma-Aldrich) (plásmido pGEM-T), o con 10 µg/ml de kanamicina (Sigma-Aldrich) (plásmidos pEM-dsRED y pMirTarget).

### 4.2. Enzimas de restricción y modificación del DNA

Los tratamientos con enzimas de restricción y modificación de DNA (DNA ligasa del bacteriófago T4, DNA polimerasa de T4 y T4 Polinucleótido kinasa) (Roche o New England Biolabs) se realizaron siguiendo protocolos estándar (Sambrook y Russell, 2001) y las indicaciones de los proveedores. La secuencia de los plásmidos contruídos se confirmó mediante secuenciación (Macrogen, Korea).

### 4.3. Amplificación del DNA mediante PCR

Las reacciones de PCR se realizaron utilizando la enzima *Amplitaq DNA polymerase* (Applied Biosystems). Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador *SimpliAMP<sup>TM</sup>* (Applied Biosystems), en un volumen final de 20-25 µl, utilizando 1 U de *Amplitaq DNA polymerase*, 20 pmoles de los oligonucleótidos correspondientes, una mezcla de 0,25 mM de cada uno de los desoxinucleótidos trifosfato (ThermoFisher Scientific), 1,25 mM de MgCl<sub>2</sub> y 25-50 ng de DNA molde. Para amplificar regiones del genoma viral que contenían las secuencias de los svRNAs se utilizaron oligos de PCR (Sigma-Aldrich) que hibridaban unos 300 nt hacia el 5' del genoma y otros 300 nt hacia el 3', tomando como referencia cada uno de los svRNAs nsp3.1, nsp3.2 o N. Para la detección del procesamiento del mRNA (*splicing*) entre los exones de RFP y la presencia de sitios alternativos en las regiones que contienen los svRNAs, se realizó la PCR con el cDNA de la RT como molde y los oligos pEM-exón1-VS (ACCTGGTGGAGTTCAAGTCC) y pEM-exón2-RS (CACTCAAGTGTATGGCCAGA).

Las condiciones de reacción se ajustaron en función de temperatura de hibridación de los oligonucleótidos (T<sub>m</sub>) y la longitud del fragmento a amplificar, de la siguiente forma: (a) 94°C, 5 minutos; (b) 25-35 ciclos 94°C, 1 minuto; (T<sub>m</sub>-10°C), 1 minuto; 72°C, 1 minuto/Kpb; (c) 72°C, 10 minutos.

### 4.4. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La separación de fragmentos de DNA se realizó en geles de agarosa D-1 (Medio electroendósmosis EEO, Pronadisa) al 0,7-1,2% en TAE (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA) teñidos con SYBR® Safe DNA gel stain 1x (ThermoFisher Scientific). Los fragmentos de DNA se purificaron a partir del gel de agarosa con el reactivo QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen).

## **5. INFECCIÓN DE RATONES CON SARS-CoV**

### **5.1. Declaración ética**

Todos los protocolos de trabajo utilizados en los experimentos con ratones fueron aprobados por la Comunidad de Madrid (número de permiso: PROEX 112/14) de acuerdo con el Real Decreto Español (RD 1201/2005), la ley española 32/2007 y las normas internacionales de la Unión Europea 2010/63/UE sobre la protección y el manejo de los animales de experimentación.

### **5.2. Cepas de ratón**

Para estudiar la relevancia de los ncRNAs en la patogénesis del SARS-CoV se utilizaron hembras de ratones BALB/c-OlaHsd (Harlan) de 16 semanas de edad libres de patógenos específicos. La manipulación de ratones infectados se llevó a cabo en un laboratorio de bioseguridad de nivel 3 del CISA-INIA equipado con infraestructura de contención similar a la descrita en el apartado 2.1. para el trabajo con cultivos celulares, y además, con una unidad ventilada de contención para mantener a los animales durante el desarrollo del experimento (*Animal transport unit-Bio containment unit*, Harvard, USA)

### **5.3. Inoculación y seguimiento de la enfermedad**

Los ratones se anestesiaron con isoflurano y se inocularon intranasalmente con  $10^5$  ufp del virus SARS-CoV correspondiente en un volumen de 50  $\mu$ l de DMEM suplementado con 2% de FBS. Se monitorizó diariamente el peso, los síntomas de la enfermedad y la supervivencia de los animales inoculados durante un periodo de 10 días. Los animales que alcanzaron pérdidas de peso superiores al 25% fueron sacrificados de acuerdo con los protocolos de eutanasia establecidos.

Para el estudio funcional del svRNA-N derivado de SARS-CoV con inhibidores antisentido, los ratones se anestesiaron con isoflurano y se inocularon intranasalmente 24 h antes de la infección viral utilizando 200  $\mu$ g del inhibidor en un volumen de 50  $\mu$ l de PBS. Estos inhibidores consistían en oligonucleótidos químicamente modificados con la tecnología LNA, análogos de RNA con los grupos funcionales de la ribosa “bloqueados” (*miRCURY LNA microRNA Inhibitor*, Exiqon), con secuencia complementaria al svRNA, también conocidos como “*antagomirs*”.

### **5.4. Extracción de sangre**

Para la extracción de sangre, se anestesiaron los ratones y se les practicó una punción cardiaca. La sangre se extrajo hasta la exanguinación completa para asegurar la muerte de los animales. La toma de muestras de sangre se realizó los días 2 y 4

después de la infección (ddi). Se obtuvieron volúmenes de sangre variables en cada ratón, entre 0,5-1ml.

Para preparar el suero, la sangre se incubó en un baño a 37°C durante 1 h y posteriormente a 4°C durante 24 h. A continuación, la sangre se centrifugó durante 10 min a 10000xg para separar el suero del coágulo sedimentado. El suero recuperado se volvió a centrifugar para clarificarlo. El suero obtenido se repartió en alícuotas de 100 µl de un solo uso y se congeló a -80°C.

### **5.5. Aislamiento de virus de pulmones**

A 2 y 4 ddi los ratones se sacrificaron para la toma de muestras del pulmón. Los pulmones se fotografiaron y pesaron. El pulmón derecho se seccionó longitudinalmente en dos mitades. Una de ellas se congeló a -80°C para su homogeneización posterior y aislamiento de virus. La mitad de esta muestra se homogeneizó en tubos tipo C (Miltenyi Biotec), especiales para disociar tejidos, en el homogeneizador MACS (Miltenyi Biotec) con 2 ml de PBS que contenía 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 50 µg/ml de gentamicina y 0,5 µg/ml de fungizona y se homogeneizó aplicando el programa Lung\_02 dos veces consecutivas para recuperar virus. El homogeneizado se centrifugó 10 min a 3000xg y el sobrenadante se congeló a -80°C hasta su análisis para determinar el título viral en cultivos celulares, de acuerdo con lo descrito en el apartado 2.2.

### **5.6. Extracción de RNA de pulmones y suero**

La mitad longitudinal del pulmón derecho de los ratones a 2 y 4 ddi se conservó en *RNA later* (Ambion) a 4°C durante 24 h para preservar la integridad de las moléculas de RNA y posteriormente se congeló a -80°C hasta su homogeneización para extracción del RNA. La muestra se resuspendió en 2 ml de solución de lisis-unión del reactivo *miRVana miRNA Isolation kit* (Ambion) y en tubos tipo M, especiales para aislar biomoléculas tipo RNA, se homogeneizó en el homogeneizador MACS (Miltenyi Biotec) aplicando el programa RNA\_02 específico para extraer RNA de tejidos congelados. El homogeneizado se centrifugó 10 min a 3000xg y el sobrenadante se congeló a -80°C hasta la extracción del RNA. Para la extracción de RNAs de pequeño tamaño (<200 nt) y de gran tamaño (>200 nt) se tomaron 700 µl de homogeneizado y se procedió de acuerdo con el protocolo del kit *miRVana miRNA Isolation kit* (Ambion) para la separación de RNAs pequeños a partir del RNA total. La extracción de RNA del suero de los ratones se realizó partiendo de 100 µl de suero (apartado 5.4. de esta sección), de acuerdo con las especificaciones del kit *miRNeasy Serum kit* (Qiagen).

### 5.7. Histopatología

Para la preparación de muestras para examen histopatológico, el pulmón izquierdo de ratones sacrificados a días 2 y 4 di se fijó en formalina de zinc al 10% durante 24 h a 4°C y se incluyó en parafina en el servicio de histología del CISA-INIA. En el servicio de histología del CNB-CSIC se prepararon series de cuatro secciones consecutivas de 5 µm cada 50 µm de muestra. La primera sección de cada serie se tiñó con hematoxilina y eosina para obtener un muestreo representativo de todo el pulmón.

Las preparaciones se examinaron en un microscopio *ZEISS Axiophot* con el objetivo 10x. Se cuantificó la patología del tejido pulmonar observando 50 campos microscópicos escogidos al azar entre las preparaciones de cada ratón y asignándoles una calificación entre 0 y 3, de acuerdo con la presencia de inflamación intersticial, peribronquioalveolar o perivascular, según los criterios descritos (Page y col., 2012). Las puntuaciones de los ratones de cada grupo se analizaron estadísticamente y se representaron en histogramas. Se tomaron imágenes representativas del daño observado con el programa *NIS-Element F 2.20* en modo *Binning*, que mejora la señal respecto del ruido, y contraste aumentado (*Enhanced Autowhite*).

### 5.8. Inmunohistoquímica

Secciones de 5 µm de pulmones fijados en formalina de zinc e incluidos en parafina como se ha descrito en el apartado 5.7, se desparafinaron a 60°C y se rehidrataron en sucesivas incubaciones en 100% xylol, 100% etanol y 96% etanol. Las secciones se hirvieron en tampón citrato (8,2 mM citrato sódico, 1,8 mM ácido cítrico a pH 6,5) durante 5 minutos a 110°C para el desenmascaramiento de los antígenos. Las muestras se permeabilizaron con 0,25% Tritón X-100 en TBS (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl) durante 15 minutos y se bloquearon con una solución al 10% FBS y 1% de albúmina de suero bovino (BSA) en TBS durante 2 horas. Para la detección del antígeno, las muestras se incubaron con un anticuerpo monoclonal específico de la proteína N del SARS-CoV (Ascites SA87-A1) diluido 1:250 durante 2 horas a temperatura ambiente. La actividad peroxidasa endógena se bloqueó añadiendo 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en TBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario específico de ratón conjugado a la peroxidasa del rábano picante (HRP) (Sigma-Aldrich) diluido 1:250 durante 1 hora a temperatura ambiente. La detección de HRP se realizó de acuerdo con las especificaciones del fabricante (*Metal Enhanced DAB Substrate Kit*, Thermo Scientific). Las muestras se tiñeron con hematoxilina y se examinaron en un microscopio *ZEISS Axiophot* con el objetivo 10x y 20x.

## **6. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DEL RNA**

### **6.1. Análisis del RNA extraído de pulmones**

Las fracciones de RNA de pequeño (<200 nt) y de gran tamaño (>200 nt) purificadas a partir de los pulmones de ratón (apartado 5.6.) se utilizaron para el análisis por secuenciación masiva. Su concentración y calidad se determinaron mediante el equipo *Bioanalyzer 2100 expert\_Eukaryote Total RNA*. Las muestras se guardaron a -80°C hasta su utilización. El RNA que se utilizó en ensayos de expresión génica mediante transcripción reversa y amplificación en cadena de la polimerasa (RT-PCR) se cuantificó mediante espectrofotometría, utilizando *NanoDrop ND-1000* (NanoDrop Technologies, EEUU).

### **6.2. Secuenciación Masiva**

Se utilizó 1 µg de la fracción de RNA de pequeño tamaño (<200 nt) extraído de los pulmones de ratones infectados para la secuenciación masiva de RNAs pequeños. La empresa *BGI Genomics* (Hong Kong) construyó las librerías de RNAs pequeños (Illumina). La preparación de las muestras incluía purificar de gel los RNAs de tamaños comprendidos entre 18 y 30 nt, a los que unieron adaptadores en ambos extremos 5' y 3'. Posteriormente, se generó el cDNA complementario, y se amplificó por PCR usando oligonucleótidos que hibridaban en los adaptadores. La librería de cDNAs con adaptadores se secuenció en un secuenciador HiSeq 2000 (Illumina). Se obtuvieron lecturas de 50 nt en un solo sentido (*single end*) y en las que la cadena complementaria estaba marcada para poder distinguir el sentido original de las secuencias. Se secuenciaron las réplicas biológicas de cada uno de los grupos analizados no infectados (dos réplicas) o infectados con SARS-CoV-wt y SARS-CoV-ΔE (tres réplicas cada grupo). De cada muestra se obtuvieron entre 20-40 millones de secuencias.

Se utilizaron 6 µg de la fracción de RNA de gran tamaño (>200 nt) extraído de los pulmones de ratones infectados para secuenciación masiva RNAseq. En el servicio de genómica del Parque Científico de Madrid (PCM) las muestras se trataron con la enzima *DNase I* (Roche) para eliminar posibles contaminaciones de DNA. El RNA se procesó con el reactivo *Ribo-Zero rRNA Removal kit* (Epicentre) para eliminar el rRNA, un componente mayoritario en las muestras de RNA de gran tamaño, y enriquecer las secuencias resultantes en RNAs expresados menos abundantemente como los mRNAs o lncRNAs. El RNA se purificó con el reactivo de *RNeasy Mini kit* (Qiagen) y se construyeron las librerías *NEBNext Ultra directional Library prep A* (Illumina), que se secuenciaron en un equipo HiSeq 2000 (Illumina). Se obtuvieron lecturas de 100 nt en un solo sentido (*single end*) en las que la cadena complementaria estaba marcada



para poder distinguir el sentido original de las secuencias. Se utilizó actinomicina D en la reacción de síntesis del DNA complementario (cDNA) para reducir la síntesis espuria de DNA a partir del cDNA, que da lugar a lecturas antisentido artefactuales. Se secuenciaron dos réplicas biológicas de los ratones no infectados y tres réplicas biológicas de los ratones infectados de cada condición experimental. De cada muestra se obtuvieron 20 millones de secuencias.

### 6.3. Generación de cDNAs mediante RT-PCR

La síntesis de cDNAs o retrotranscripción (RT) a partir de RNAs de gran tamaño (>200 nt) se realizó con el reactivo *High Capacity cDNA RT Kit* (ThermoFisher Scientific), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, utilizando 100 ng de RNA molde y oligonucleótidos de secuencia aleatorios. Para la síntesis de cDNAs a partir de RNAs de pequeño tamaño (<200 nt) se utilizó el mismo reactivo empleando 10 ng de RNA molde y los oligonucleótidos de secuencia específica idénticos a los utilizados posteriormente en la cuantificación por PCR mediante *TaqMan Small RNA Assay* (ThermoFisher Scientific) (Tabla I).

Una fracción del cDNA generado (1/100 a 1/10 del volumen de reacción) se utilizó como molde para su amplificación por PCR, utilizando oligonucleótidos específicos (apartado 6.4. de esta sección).

Tabla I. Ensayos TaqMan usados para la cuantificación por RT-qPCR de mRNAs celulares y RNAs pequeños (sRNA) virales y celulares.

mRNA	Ensayo TaqMan	sRNA	Ensayo TaqMan
<b>CCL2</b>	Mm00441242_m1	<b>sv-nsp3.1</b>	CS11LZW
<b>IL6</b>	Mm00446190_m1	<b>sv-nsp3.2</b>	CSKAJ54
<b>CXCL10</b>	Mm00445235_m1	<b>sv-N</b>	CSHSNTO
<b>ISG15</b>	Mm01705338_s1	<b>sv-neg</b>	CS6RM99
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Mm01168134_m1	<b>cel-miR-39</b>	001973
<b>MX1</b>	Mm00487796_m1	<b>snRNA-U6</b>	00200
<b>IL4</b>	Mm00445259_m1		
<b>18s rRNA</b>	Mm03928990_g1		

### 6.4. Cuantificación de RNAs mediante RT-PCR cuantitativa

La expresión de los mRNAs virales o celulares se analizó mediante RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR), utilizando la tecnología *SYBR®* o *TaqMan®*, según se indique. La tecnología *SYBR®* se utilizó para la cuantificación de mRNAs virales, empleando el reactivo *SYBR®Green PCR Master Mix* (ThermoFisher Scientific) y oligonucleótidos específicos diseñados con el programa *Primer Express v2.0* (ThermoFisher Scientific) (Tabla II). Para cada reacción de amplificación, se optimizó la concentración de oligos para evitar que formaran dímeros y para obtener la máxima eficiencia. La tecnología

*TaqMan*® se empleó para la cuantificación de mRNAs celulares o RNAs de pequeño tamaño, utilizando ensayos *TaqMan*® comerciales o a medida, respectivamente (ThermoFisher Scientific) (Tabla I). En todos los casos, la reacción se realizó con el reactivo *FastStart Universal Probe Master (Rox)* (Roche).

**Tabla II. Oligonucleótidos usados para la cuantificación por RT-qPCR del RNA viral.**

<b>Amplicon</b>	<b>Oligo-VS (secuencia 5'→3')</b>	<b>Oligo-RS (secuencia 5'→3')</b>	<b>Posición en genoma, nt</b>
<b>gRNA (+)</b>	ACCACTCAATTCCTGA TTTGCA	ATGGCGTCGACAAGA CGTAAT	1931-2015
<b>gRNA (-)</b>	TGGTGACAGCTGCTC TTTGC	CGCGCACACTTGATG CA	1910-1969
<b>sgmRNA-N (+)</b>	CAACCAACCTCGATCT CTTGTAGA	CATTCTGGTTATTGTC AGTTGAATCTG	31-28210
<b>sgRNA-N (-)</b>	TGGGTCCACCAAATGT AATGC	GCCAACCAACCTCGA TCTCTT	29-28183

RNA viral genómico (gRNA) y subgenómico de la nucleoproteína (N) de polaridad positiva (+) y negativa (-), respectivamente. Se indica la secuencia del oligonucleótido con sentido viral (VS) y con sentido reverso (RS), y la posición en nucleótidos (nt) de los oligonucleótidos en el genoma del virus.

Las reacciones de qPCR se realizaron en un equipo *7500 Real Time PCR System* (ThermoFisher Scientific), utilizando los parámetros de termociclación: (a) 95°C, 10 min; (b) 95°C, 15 seg; (c) 60°C, 1 min; repetidos en 40 ciclos. Cuando se utilizó la tecnología *SYBR*®, después de la amplificación se añadió un ciclo de desnaturalización para obtener la curva de disociación del producto amplificado. Los datos de qPCR se analizaron utilizando el programa *7500 software v2.0.6* (ThermoFisher Scientific). Todos los experimentos cumplieron con las recomendaciones para el análisis de la expresión génica mediante RT-qPCR (MIQE) (Bustin y col., 2009). Para aumentar la confianza en el análisis estadístico, cada resultado era el promedio de tres experimentos independientes en los que cada muestra se analizó por triplicado. La cuantificación relativa de la expresión génica se realizó a partir de los valores medios de Ct (ciclo en el que la curva de amplificación corta al nivel umbral utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak y Schmittgen, 2001). El nivel del rRNA 18s se utilizó como control endógeno para normalizar los niveles de los mRNAs celulares y del gRNA y sgmRNA-N virales, dado que su expresión permanece invariada durante la infección con SARS-CoV. Los niveles de RNAs de pequeño tamaño se normalizaron con los niveles del control endógeno snRNA-U6, excepto en las muestras de suero, en las que se utilizó como control de carga el miRNA de *C. elegans*, cel-39-3p (Exiqon), añadido en igual cantidad a todas las muestras antes de la purificación del RNA.

### 6.5. Electroforesis y detección de RNA por sondas (*northern blot*)

El RNA total (12 µg) extraído de células MDCK transfectadas con plásmidos con secuencias precursores de svRNAs para resolver los RNAs de pequeño tamaño en geles de acrilamida al 15% urea 7 M, de acuerdo con el protocolo previamente descrito (Pall y Hamilton, 2008). Se utilizaron como marcador de peso molecular RNAs de 20-100 nt de longitud (*Prestained Marker for Small RNA Plus*, DynaMarker). El RNA se transfirió a membranas de nylon, y se fijó con una solución 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) (EDC) durante 1 h a 60°C. Las membranas se bloquearon a 65°C durante al menos 1 h con una solución de bloqueo (citrato de sodio salino (SSC) 6x y dodecilsulfato sódico (SDS) al 7%) antes de hibridar con sondas marcadas radioactivamente.

Los oligos de DNA utilizados como sondas tenían secuencias complementarias a los svRNAs derivados de SARS-CoV y a los RNA control, snRNA-U6 y miR-93-5p, (Tabla III). Se marcaron 30 moles de cada oligo (Sigma-Aldrich) radioactivamente con 30 µCi de  $\gamma$ [P<sup>32</sup>] ATP (Perkin Elmer) utilizando la T4 polinucleótido quinasa (New England Biolabs), como indica el fabricante. Las sondas marcadas se purificaron en columnas defiltración en gel molecular (*Sephadex G25*, GE Healthcare) según las recomendaciones del fabricante y se incubaron con las membranas en la misma solución de bloqueo a 42°C durante 16 h. Las membranas se lavaron con solución de lavado (SSC 3x y SDS 0,1 %) 3 veces durante 10 min cada vez a 42°C, se secaron y se expusieron en una pantalla de captura de imagen (*Personal Molecular Imager*, Biorad). La detección de imágenes digitales se realizó con el programa *Quantity One*. Para volver a hibridar las membranas con las sondas de los controles, se incubaron con solución de bloqueo a 65°C durante 16 h y se lavaron 3 veces con la misma solución a 65°C durante 20 min antes de incubarse con la nueva sonda a 42°C durante 16 h.

Tabla III. Sondas usadas para la detección de svRNAs por *northern blot*.

svRNA	Sonda (secuencia 5'→3')
nsp3.1	ATCGTCCTCTTCTTCCTC
nsp3.2	AGTCTTCCTCTTCTTCTTCCTC
N	GAAGCTTCTGGGCCAGTTCCT
neg	GGTATTACAACACAAGTGATAT
miR-124-3p	TGGCATTACCCGCGTGCCTTAA
miR-93-5p	CTACCTGCACGAACAGCACTTTG
snRNA-U6	GCCATGCTAATCTTCTCTGTATC

### 6.6. Microscopía por hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH)

Células DBT-mACE2, crecidas a una confluencia del 90% sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro en placas de cultivos de 24 pocillos, se infectaron a una multiplicidad

de infección (MDI) de 1 con SARS-CoV. Después de 24 h, las células se lavaron tres veces con PBS/dietilpírocarbonato (DEPC), se fijaron mediante incubación con paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS/DEPC durante 30 min a temperatura ambiente y se lavaron otras dos veces con PBS/DEPC. Las células se permeabilizaron incubándolas 10 min a 37°C con 2 µg/ml de proteinasa K del reactivo *miRCURY LNA microRNA ISH Optimization kit* (Exiqon) de acuerdo con las indicaciones del manual. Para reducir la inmunorreactividad de fondo, las células se lavaron dos veces con PBS/DEPC y la actividad peroxidasa endógena se bloqueó incubando con peróxido de hidrógeno al 3% (Foret) en DEPC dos veces consecutivas 3 min cada vez a temperatura ambiente. Las células previamente lavadas con PBS/DEPC se deshidrataron incubando con soluciones crecientes de etanol (Merck) al 70, 96 y 99,9% en DEPC diez veces por cada concentración durante 1 min cada vez. Finalmente, los cristales se dejaron secar durante 15 min sobre un papel limpio. La sonda de detección del svRNA-N era un oligonucleótido con secuencia complementaria modificado químicamente (*miRCURY LNA*, Exiqon) y marcado en los extremos 5' y 3' con digoxigenina (5'Dig-N/GAAGCTTCTGGGCCAGTTCCT/3'Dig-N). Las células se incubaron con la sonda preparada a una concentración de 20 nM de acuerdo con las especificaciones del manual durante 1 h a 53°C en una cámara al 95% de humedad. El exceso de sonda se retiró mediante series de lavados a 53°C con concentraciones decrecientes de SSC 5, 1 y 0,2 x, dos veces con cada solución y 5 min cada vez. Finalmente las células se lavaron con SSC 0,2 x durante 5 min a temperatura ambiente y luego con PBS/DEPC. Para la detección de la digoxigenina, los cristales se bloquearon en solución de bloqueo (0,1 % Tween-20, 2% FBS y 1% BSA en PBS/DEPC) durante 15 min a temperatura ambiente y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a la peroxidasa HRP (Roche), diluido 1:400 en solución de incubación (0,05 % Tween-20, 1% FBS y 1% BSA en PBS/DEPC). Para retirar el exceso de anticuerpo, las células se lavaron tres veces con PBS/DEPC durante 3 min cada vez. Para la detección del anticuerpo unido a la sonda, se utilizó el reactivo que cataliza la reacción peroxidasa generando fluorescencia verde (*TSA Plus Fluorescence FITC kit*, Perkin Elmer) como indica el fabricante durante 10 min a temperatura ambiente en oscuridad. Las células se lavaron tres veces con PBS/DEPC durante 5 min cada vez para detener la reacción y finalmente, las muestras se montaron sobre portaobjetos con el reactivo *ProLong Gold anti-fade* (ThermoFisher Scientific) y 4'-6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) diluido 1:200 para la tinción de núcleos. Las preparaciones se examinaron con un microscopio confocal *Leica SP5*. Las imágenes se tomaron y procesaron con el programa *LASAF* (Leica).

## 7. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LOS RESULTADOS DE SECUENCIACIÓN MASIVA DE RNAs PEQUEÑOS Y GRANDES

### 7.1. Filtrado, alineación y procesamiento de las secuencias de RNAs pequeños

Se seleccionaron las lecturas de más de 18 nt, cuya polaridad original era conocida, secuenciadas desde uno de los extremos, proporcionadas por la compañía que realizó la secuenciación masiva (BGI), y se comprobó su calidad utilizando el programa FASTQC ([www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/](http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/)). Las lecturas se alinearon frente a las secuencias del genoma de ratón (GRCm38) o del SARS-CoV con el programa BWA (Li y Durbin, 2009) permitiendo solo 1 nt no coincidente y ninguna interrupción (bwa aln -n 1 -k 1 -o 0). Sólo se consideraron los alineamientos únicos para pasos posteriores. Los archivos de alineamiento SAM generados con BWA se comprimieron, ordenaron e indexaron con las funciones *view*, *sort* e *index* del paquete *Samtools* (Li y col., 2009). El buscador genómico *SeqMonk* (<http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/seqmonk/>) se utilizó para visualizar las secuencias alineadas.

### 7.2. Identificación y caracterización de RNAs pequeños

A partir de la combinación virtual de los datos de las 16 muestras, tomando para cada nt la cobertura máxima, se definió la colección de datos unificada de los *loci* de RNAs pequeños. Se definieron como *loci* las regiones genómicas continuas que tenían una cobertura mínima de 10 lecturas en la posición central y de al menos 2 secuencias en cada lateral. En total se definieron 5.208 *loci* de 36 nt de longitud de media. Se anotaron los *loci* que coincidían con miRNAs de ratón incluidos en *miRBase v.20* (Kozomara y Griffiths-Jones, 2014).

Para cada muestra, las lecturas se asignaron a los *loci* definidos utilizando el programa *featureCounts* del paquete *SubRead* (Liao y col., 2014), de acuerdo con los parámetros preestablecidos para secuencias de polaridad conocida y de sentido único. La expresión diferencial de cada *locus* entre las distintas muestras se evaluó con el programa *edgeR* (Robinson y col., 2010). Las lecturas se normalizaron por cada millón de secuencias obtenidas en la secuenciación masiva de cada muestra y se ajustaron para calcular la relación expresado como log2 utilizando el método TMM. Para calcular el p-valor ajustado o FDR (Benjamini y Hochberg, 1995) se utilizaron dos o tres réplicas biológicas por cada condición experimental en el caso de las muestras no infectadas e infectadas, respectivamente.

### **7.3. Búsqueda de dianas de RNAs pequeños**

Para la búsqueda de dianas de los miRNAs anotados diferencialmente expresados en las distintas condiciones experimentales se utilizó la base de datos *miRTarBase* (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/search.php#advanced>). La búsqueda de dianas se restringió a los miRNAs celulares cuya expresión a 2 ddi había variado al menos 2 veces en la infección del virus atenuado respecto al virulento, con un número medio de lecturas sin procesar (*raw counts*) igual o mayor a 20 y FDR por debajo de 0,05. De todos los posibles genes diana, sólo los que habían sido validados experimentalmente con evidencias fuertes (efecto en la expresión de genes reporteros, *western blot* o qPCR) se seleccionaron para analizar en el programa de clasificación funcional *Panther* (<http://pantherdb.org>) utilizando el genoma de ratón como organismo de referencia y las anotaciones de rutas funcionales incluidas en *Panther*, sin aplicar la corrección de Bonferroni. Las rutas funcionales estadísticamente enriquecidas para los genes diana de los miRNAs celulares ( $p\text{-valor} \leq 0,1$ ) se representaron en una red de interacciones utilizando la herramienta *Cytoscape v3.2.1* (Shannon y col., 2003). Esta red relacionaba los miRNAs, sus genes diana, y las rutas funcionales en las que intervenían.

La búsqueda de dianas de los svRNAs derivados de SARS-CoV se realizó con el programa *RNAhybrid* (Rehmsmeier y col., 2004) utilizando como referencia el genoma completo del ratón GRCm38. Los parámetros establecidos fueron una interacción de 7 nt seguidos como mínimo con una energía libre inferior a -25 Kcal/mol. Como controles positivos se analizaron 10 miRNAs celulares y como controles negativos, 10 secuencias al azar del genoma del ratón que no eran miRNAs.

### **7.4. Filtrado, alineación y procesamiento de las secuencias de RNAs grandes**

Se comprobó la calidad de las lecturas de 100 nt, de polaridad original conocida, secuenciadas desde uno de los extremos y obtenidas por secuenciación masiva (servicio de genómica, PCM), utilizando el programa *FASTQC* ([www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/](http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/)). Como la calidad de las lecturas disminuyó significativamente después de la posición 76 por la aparición de indeterminaciones (N), todas las secuencias se truncaron a partir del nt 75. Los primeros 75 nt de las secuencias se alinearon con el genoma del ratón GRCm38 utilizando el programa *TopHat2* (Kim y col., 2013) en las condiciones estándar de alineamientos desde un único origen y permitiendo intrones de hasta 100.000 nt de longitud. El alineamiento de secuencias se visualizó con el buscador genómico *SeqMonk* (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/seqmonk>) y el programa IGV (Robinson y col., 2011).

### 7.5. Expresión diferencial de los caracteres genómicos

La asignación de las lecturas a genes o lncRNAs de ratón se realizó con la función *htseq-count* del paquete de programas *HTSeq* (Anders y col., 2015). Los genes y otros caracteres genómicos coordinados se marcaron en la secuencia de DNA a partir de la versión anotada del genoma de ratón GRCm38.76 (*ENSEMBL*). La evaluación de la expresión diferencial de los genes en el pulmón de ratones infectados con el virus SARS-CoV-ΔE y wt a 2 ddi se realizó con el programa *DESeq2* (Love y col., 2014) utilizando los parámetros basales sin aplicar la detección de lecturas atípicas por distancia de Cook (*cooksCutoff=FALSE*). Para determinar el p-valor ajustado o FDR (Benjamini y Hochberg, 1995) se analizaron dos o tres réplicas biológicas por cada condición experimental de no infección o infección, respectivamente.

Se utilizó el servidor FIESTA (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/FIESTA>) para visualizar los resultados de expresión diferencial de genes después de aplicar distintos parámetros estadísticos (*fold-change* y FDR). Se seleccionaron para estudios funcionales los RNAs diferencialmente expresados en la infección con el virus ΔE y wt con variaciones iguales o mayores que 2 y FDR≤0,05 utilizando el programa (<http://genecodis.cnb.csic.es/>) que clasificó en grupos funcionales significativamente enriquecidos (p-valor<0,01) a los mRNAs diferencialmente expresados.

## 8. CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS

### 8.1. Construcción de plásmidos

El plásmido de alto número de copia pGEM-T *Easy* (Promega) se utilizó para clonar los productos de PCR con secuencias virales que contenían los svRNAs nsp3.1, nsp3.2 y N flanqueados por las dianas de restricción *Spe* I y *Not* I (Roche). Los fragmentos digeridos con *Spe* I y *Not* I se clonaron en los mismos sitios del plásmido pEM-dsRED cedido por el Dr. Ben tenOever (Escuela de Medicina del Monte Sinaí, Nueva York, USA). Este plásmido incluye los dos exones de la proteína roja fluorescente (RFP) separados por un intrón donde se insertaron las secuencias virales que incluían los svRNAs. El plásmido pEM-dsRED-miR-124 (Varble y col., 2010) incluía el precursor del miRNA-124 celular en el intrón y se utilizó como control positivo de la biogénesis de miRNAs. En las células transfectadas con el plásmido, el procesamiento del mRNA o *splicing* liberaba el lazo con la secuencia precursora del svRNA o del miR-124 así como el mRNA maduro de dsRNA cuya expresión se observaba como fluorescencia roja en el microscopio ZEISS *Axiophot*.

El plásmido pMirTarget (Origene) incluye el gen de la proteína roja fluorescente y el de la luciferasa, en cuya región 3' UTR hay un sitio de clonaje múltiple que se utilizó

para introducir las secuencias diana complementarias de los svRNAs nsp3.1, nsp3.2 y N y de los controles positivos mmu-miR-124-3p y mmu-miR-877-5p.

## 8.2. Construcción de plásmidos para estudiar el procesamiento de svRNAs por enzimas celulares

Las regiones de genoma que contenían el svRNA-N y un control negativo (neg), que no tuvo lecturas en la secuenciación masiva, se amplificaron con oligonucleótidos que hibridaban unos 300 nt hacia el 5' y otros 300 nt hacia el 3' de los svRNAs. Debido a la proximidad del svRNA-nsp3.1 y el svRNA-nsp3.2, por un lado se obtuvo una misma región amplificada del genoma viral que contenía a ambos (nsp3) de unos 600 nt y, por otro lado, otras dos regiones de menor tamaño (unos 400 nt) que incluían a los svRNAs nsp3.1 y nsp3.2 por separado. Los oligonucleótidos que hibridaron en el sentido del genoma incorporaron la secuencia diana para la enzima de restricción *Spe* I, mientras que los oligonucleótidos antisentido contenían la diana de *Not* I (Tabla IV).

**Tabla IV. Oligonucleótidos usados para la construcción de los fragmentos precursores de los RNAs virales pequeños (svRNAs).**

svRNA	Oligo-VS (secuencia 5'→3')	Oligo-RS (secuencia 5'→3')	Posición en genoma, nt
<b>nsp3</b>	GGactagtTGAATCCGGTAC CGAAGTTA	TAgcggccgcATCACTCTC CTTTTGCATGG	2853-3462
<b>nsp3.1</b>	GGactagtTGATGCTGGTGA AGAAAACT	TAgcggccgcAACTGTTTC AGCTGAGGCAC	2994-3177
<b>nsp3.2</b>	GGactagtAGGTCTCCCTCT GGAATTTG	TAgcggccgcATTTAATGG CAACATTGTCA	3138-3322
<b>N</b>	GGactagtACAGATTCAACTG ACAATAA	TAgcggccgcCAATCTGTC TAGCAGCAATA	28183-28803
<b>neg</b>	GGactagtGAAGATTCCAAAA CTGAGGA	TAgcggccgcATATAGGCA TTAATTTTCTT	3826-4366

La diana del enzima de restricción *Spe* I (actagt) indicada en minúscula se encuentra en los oligonucleótidos que hibridan en el sentido del genoma viral (VS). La diana del enzima de restricción *Not* I (gcggccgc) indicada en minúscula se encuentra en los oligonucleótidos que hibridan en el sentido opuesto del genoma viral (RS). Se indica la posición en nucleótidos (nt) de los oligonucleótidos en el genoma del virus.

Los correspondientes productos de PCR se clonaron en el vector pGEM-T *Easy* (Promega) de acuerdo con las indicaciones del fabricante y se digirieron con las enzimas *Spe* I y *Not* I para el posterior clonaje en los mismos sitios del plásmido pEM-dsRED.



### 8.3. Construcción de plásmidos para estudiar el silenciamiento de la expresión de un mRNA diana por svRNAs

Las secuencias diana para los svRNAs nsp3.1, nsp3.2 y N, para los miRNAs celulares mmu-miR-877-3p y mmu-miR-877-5p y para el control positivo mmu-miR-124-3p se obtuvieron por síntesis química (*GeneArt*, ThermoFisher Scientific) y consistían en diez repeticiones de la secuencia complementaria a cada svRNA o miRNA separadas por 8 nt correspondientes al sitio de restricción *Not* I (Tabla V). Cada secuencia diana, de unos 300 pb, estaba flanqueada por sitios de restricción únicos para ser introducidos en los mismos sitios del 3' UTR del gen marcador luciferasa en el plásmido pMirTarget (Origene). Los plásmidos pMirTarget con las dianas de svRNAs o miRNAs se transfectaron en células DBT-mACE2 para analizar el silenciamiento de la expresión de luciferasa por svRNAs o miRNAs.

Tabla V. Secuencias complementarias de los svRNAs y los miRNAs controles positivos diseñados como diana en plásmidos para ensayos de represión con el gen reportero luciferasa.

svRNA	Secuencia diana 5'→3'	Enzimas de restricción flanqueantes
nsp3.1	(ATCGTCCTCTTCTTCCTCgcggccgc) <sup>10</sup>	EcoRI-Ascl
nsp3.2	(AGTCTTCCTCTTCTTCTTCCTCgcggccgc) <sup>10</sup>	Ascl-RsrII
N	(GAAGCTTCTGGGCCAGTTCCTgcggccgc) <sup>10</sup>	RsrII-MluI
miR-124-3p	(GGCATTACCGCGTGCCTTAgcggccgc) <sup>10</sup>	MluI-XbaI
miR-877-5p	(CCCTGCGCCATCTCCTCTACgcggccgc) <sup>10</sup>	EcoRI-Ascl
miR-877-3p	(TGGGAGGAGGGAGAAGAGGACAgcggccgc) <sup>10</sup>	Ascl-RsrII

Cada secuencia diana está repetida 10 veces separada por el sitio de restricción del enzima *Not* I (gcggccgc) en minúscula. Se indican las respectivas secuencias de las enzimas de restricción usadas para introducir cada diana en el plásmido pMirTarget.

## 9. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS

### 9.1. Transfección reversa de inhibidores de svRNAs

Células DBT-mACE2 crecidas al 80% de confluencia en placas de 100 mm de diámetro (p100) se tripsinizaron, se sembraron en placas de 24 pocillos (M24) y se transfectaron con los inhibidores de cada uno de los svRNAs derivados de SARS-CoV a una concentración de 75 nM ó 50, 75 y 100 nM en el caso del experimento de dosis-respuesta (Tabla VI) y 1,5 µl del reactivo de transfección *TransIT-X2* (Mirus), siguiendo las instrucciones del fabricante. Estos inhibidores consistían en oligonucleótidos con secuencia complementaria a los svRNAs (miScript miRNA inhibidores, Qiagen). Después de un periodo de incubación de 6 h a 37°C, los complejos de transfección se retiraron mediante lavados con medio de cultivo, las células se incubaron con DMEM 2% FBS durante 18 h adicionales y a continuación se infectaron con el virus SARS-CoV wt a una mdi de 1. Los sobrenadantes, el RNA total y las proteínas celulares se

recogieron para su posterior análisis a las 24, 48 y 72 hdi.

**Tabla VI. Secuencias de miScript miRNA mimic e inhibidores de los svRNAs y miRNAs control positivo.**

svRNA	Mimic (secuencia 5'→3')	Inhibidor (secuencia 5'→3')
nsp3.1	GAGGAAGAAGAGGACGAU	ATCGTCCTCTTCTTCCTC
nsp3.2	GAGGAAGAAGAAGAGGAAGACU	AGTCTTCCTCTTCTTCTTCCTC
N	AGGAACUGGCCAGGAAGCUUC	GAAGCTTCTGGGCCAGTTCCT
neg	AAUCAGUUUACUGGUUAUUUAA	TTAAATAACCAAGTAACTGATT
miR-877-5p	GUAGAGGAGAUGGCGCAGGG	CCCUGCGCCAUCUCCUCUAC
miR-877-3p	UGUCCUCUUCUCCUCCUCCCA	UGGGAGGAGGGAGAAGAGGACA

Las secuencias se encargaron a Qiagen para los ensayos en cultivos celulares.

## 9.2. Transfección reversa de plásmidos

Para el análisis del procesamiento de svRNAs o del silenciamiento de un mRNA diana marcador por svRNAs, células MDCK o DBT-mACE2, respectivamente, crecidas al 80% de confluencia en placas p100 se tripsinizaron, se sembraron en placas M24 y se transfectaron con 500 ng de los plásmidos correspondientes y 1,5 µl del reactivo de transfección *TransIT-X2* (Mirus), siguiendo las instrucciones del fabricante.

9.2.1. Las células MDCK se incubaron durante 6 h a 37°C con los complejos de transfección. Después de 18 h adicionales, se comprobó en el microscopio de fluorescencia la aparición de la fluorescencia roja de dsRed2 al producirse el procesamiento del RNA (*splicing*) que liberaba el lazo con el precursor del svRNA a partir del intrón y el mRNA maduro dsRed. El RNA total de las células MDCK se recogió para su análisis por *northern blot*.

9.2.2. Para estudiar el silenciamiento de la expresión de un gen marcador por svRNAs miméticos, las células DBT-mACE2 se incubaron durante 6 h a 37°C con los complejos de transfección que incluían el gen marcador diana de los svRNAs. A continuación se volvieron a transfectar con RNAs con la secuencia de los svRNAs (miScript miRNA mimic, Qiagen) (Tabla VI) a una concentración de 25 nM e inhibidores con secuencia complementaria a los svRNAs (miScript miRNA inhibidores, Qiagen) (Tabla VI) a una concentración de 75 nM. Tanto los RNAs miméticos como los inhibidores formaron complejos con 0,75 µl del reactivo de transfección *TransIT-X2* (Mirus) de forma separada, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se incubaron con DMEM 2% FBS 18 h adicionales y se obtuvieron los lisados para el ensayo luciferasa.

9.2.3. Para estudiar el silenciamiento de la expresión de un gen marcador por svRNAs producidos en la infección, las células DBT-mACE2 se incubaron durante 6 h a 37°C con los complejos de transfección que incluían el gen marcador. A continuación se infectaron con SARS-CoV wt a una mdi de 1. Las células se incubaron con DMEM 2% FBS 18 h adicionales y se prepararon los lisados células para el ensayo luciferasa.

## 10. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

### 10.1. Inmunodetección de proteínas (*western blot*)

Se generaron extractos de proteínas de células DBT-mACE2 crecidas en pocillos de M24 transfectadas con inhibidores de svRNAs e infectadas con SARS-CoV wt a una mdi de 1 a 8, 16, 24, 48 y 72 hdi. Para la lisis celular se incubó la monocapa con 50 µl de tampón de carga (*NuPAGE Sample Buffer*, Novex, ThermoFisher Scientific) suplementado con ditioneitol (DTT) 100 mM e inhibidor de proteasas 1x (*Complete Mini V10*, Roche). Los extractos de proteínas se sonicaron (2 pulsos de 5 segundos, 10 vatios de intensidad, sonicador *VC50 VibraCell*, Sonics&Materials) antes de analizarse en geles de acrilamida-SDS desnaturalizantes en gradiente (*NuPAGE Novex 4-12% Bis/Tris Precast Gels*, ThermoFisher Scientific) utilizando MOPS como solución electrolito (*NuPAGE MOPS SDS Running Buffer*, Novex, ThermoFisher Scientific). Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare), mediante el sistema *Trans-Blot® Turbo™ Transfer System* (Bio-Rad). Las membranas se bloquearon con leche en polvo al 5% en TBS durante 1 h a temperatura ambiente y se incubaron con los anticuerpos primarios específicos que reconocen las proteínas de SARS-CoV nsp3 (dilución 1:2000, Rockland) y N (dilución 1:1000, Ascites SA87-A1) y la proteína β-actina (dilución 1:10000, Abcam) como control de carga, diluidos en TBS con leche en polvo al 3% durante 12 h a 4°C. A continuación, las membranas se lavaron 3 veces con TTBS (20 mM TRIS-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20) y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado a la peroxidasa HRP (Sigma-Aldrich), específico para la especie del anticuerpo primario correspondiente diluido 1:30000 en TTBS con leche en polvo al 3%. Después de lavar las membranas con TTBS tres veces 5 min cada vez, los anticuerpos unidos se detectaron utilizando el reactivo *Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate* (Millipore) y un captador de imágenes *ChemiDoc XRS<sup>+</sup> System* (Bio-Rad), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

### 10.2. Inmunomicroscopía de fluorescencia indirecta (inmunofluorescencia)

Células ST, crecidas sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro en placas de

cultivos de 24 pocillos a una confluencia del 80%, se infectaron a una mdi de 1 con el virus TGEV PUR46-MAD. Después de 8 h, las células se lavaron tres veces con PBS, se fijaron mediante incubación con PFA al 4% en PBS durante 15 min a temperatura ambiente y se permeabilizaron mediante incubación con metanol frío durante 10 min. Para su análisis por inmunofluorescencia, las células se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con solución de bloqueo (10% BSA filtrado en PBS) durante 60 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios anti-Ago2 monoclonal de rata (SAB4200085, Sigma) y anti-TIAR policlonal de cabra (sc-1749, Santa Cruz Biotechnologies), diluidos 1:200 y 1:1000, respectivamente, en solución 5% BSA en PBS durante 60 min a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron las células tres veces con PBS. Para la detección se utilizaron anticuerpos secundarios específicos frente a rata o cabra, en función del anticuerpo primario empleado, conjugados a los fluoróforos *Alexa 594* o *Alexa 488* (ThermoFisher Scientific), respectivamente, diluidos 1:500 en solución 5% BSA en PBS. Después de la incubación con el anticuerpo secundario durante 60 minutos a temperatura ambiente, las células se lavaron tres veces con PBS y los núcleos se tiñeron por incubación con el reactivo DAPI a una concentración de 1 mg/ml durante 15 min a temperatura ambiente. Finalmente, las células se lavaron tres veces con PBS y se montaron sobre portaobjetos utilizando el reactivo *ProLong Gold anti-fade reagent* (ThermoFisher Scientific). Las muestras se examinaron con un microscopio confocal *Leica SP5 laser scanning microscope* (Leica). Las imágenes se tomaron y procesaron con el programa *LASAF* (Leica).

### **11. ENSAYO DE ACTIVIDAD LUCIFERASA**

Las células DBT-mACE2 transfectadas con los plásmidos pMirTarget con el gen diana luciferasa y después o bien transfectadas con RNAs miméticos e inhibidores de svRNAs o bien infectadas (apartado 9.2. de esta sección) se lisaron con 40 µl de la solución de lisis del sistema de ensayo luciferasa (Promega) y de acuerdo con las especificaciones del fabricante. En primer lugar, para normalizar los niveles de transfección, la fluorescencia roja emitida por la proteína roja fluorescente (RFP) en 20 µl de lisado celular se midió en placas transparentes de 96 pocillos con las paredes opacas (*Colstar*, Corning) en el lector de fluorescencia de microplacas (*Tecan INFINITE F200*) excitando a 550 y absorbiendo a 590 nm con una ganancia de 100. A continuación, se añadió a los lisados 100 µl del reactivo del ensayo luciferasa (Promega) y se midió la luminiscencia emitida por la actividad de *Firefly Luc* (560 nm) durante 10 segundos con una espera de 2 segundos entre las medidas de cada pocillo. Los resultados de *Firefly Luc* se normalizaron por la cantidad de fluorescencia

roja emitida por la proteína RFP. Se asignó el valor 100% de actividad luciferasa a las muestras transfectadas con el vector pMirTarget que expresaba el gen luciferasa. La actividad luciferasa en muestras transfectadas con este vector y además con RNAs miméticos e inhibidores de svRNAs o bien infectadas por SARS-CoV se expresó como porcentaje de ese valor.

## **12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Todos los resultados mostrados en esta memoria se expresaron como la media de los datos más la desviación estándar. Para analizar las diferencias entre los valores medios de los distintos grupos se utilizó el test de la *t de Student*. Las diferencias entre grupos se consideraron estadísticamente significativas cuando el p-valor fue inferior a 0,05 o bien inferior a 0,1 en experimentos *in vivo* (Noymer).



## RESULTADOS

---





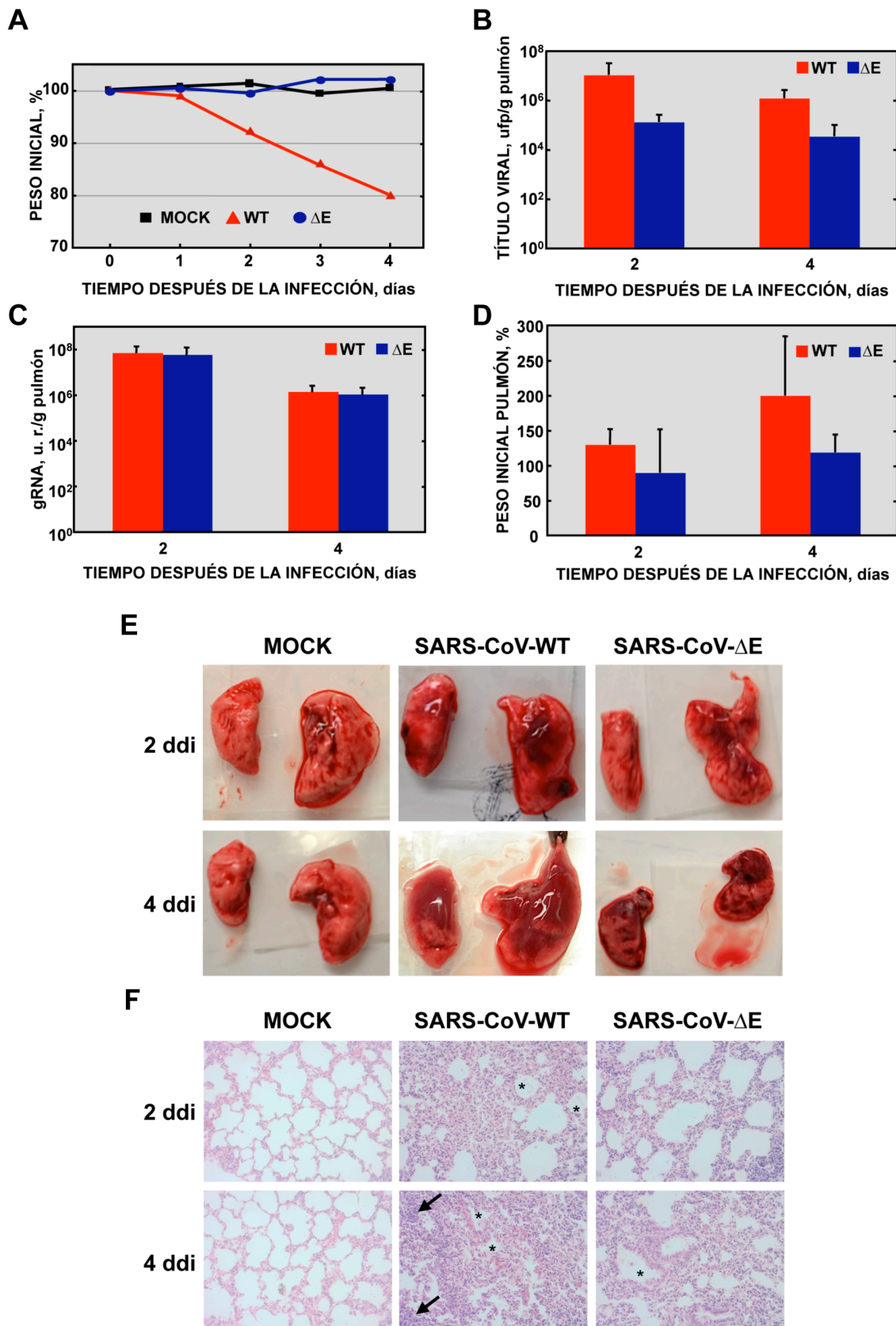
## 1. ANÁLISIS POR SECUENCIACIÓN MASIVA DE RNAs PEQUEÑOS NO CODIFICANTES EN LA INFECCIÓN DE RATONES POR SARS-CoV

En este trabajo se ha estudiado la relevancia de los RNAs no codificantes en la interacción virus-hospedador, usando como modelo experimental el virus SARS-CoV y ratones BALB/c, que reproducen la patología pulmonar causada en humanos. Dado que la regulación por ncRNAs depende en gran medida de complejas redes de interacción específicas de tejido (Ludwig y col., 2016), los resultados obtenidos *in vivo* proporcionan información sobre la relevancia fisiológica de los ncRNAs en la infección de SARS-CoV. La patología pulmonar de SARS-CoV se debe fundamentalmente a una respuesta inflamatoria muy elevada (Channappanavar y col., 2016). Por tanto, con el fin de restringir el estudio a los ncRNAs implicados específicamente en la respuesta inflamatoria, se comparó la infección del virus silvestre virulento, SARS-CoV-wt, con la del mutante de delección SARS-CoV- $\Delta$ E, que está atenuado *in vivo* (DeDiego y col., 2007). Mientras que el virus silvestre causa una inflamación pulmonar severa, pérdida de peso significativa y muerte del 100% de los ratones a partir del quinto día después de la infección, los ratones infectados con el virus atenuado SARS-CoV- $\Delta$ E no pierden peso y todos ellos sobreviven (Netland y col., 2010). Por tanto, como la única diferencia entre ambos virus es la presencia o ausencia de la proteína E, los ncRNAs diferencialmente expresados en ambas infecciones podrían estar implicados específicamente en la regulación de la patología inflamatoria causada por el SARS-CoV. Para analizar estos ncRNAs se utilizó la tecnología de secuenciación masiva de RNAs, que permite estudiar el transcriptoma completo de la célula de forma sistemática y con alto rendimiento. Dado que los RNAs no codificantes incluyen RNAs muy diferentes en tamaño, se secuenciaron independientemente la fracción de ncRNAs de pequeño tamaño (< 200 nt), que contiene los miRNAs, y la fracción de RNAs de mayor tamaño (> 200 nt) entre los que se encuentran los lncRNAs, así como los mRNAs que codifican proteínas. Esta memoria se centra fundamentalmente en los resultados obtenidos en la secuenciación masiva de ncRNAs de pequeño tamaño.

### 1.1. Infección *in vivo* y preparación de las muestras para secuenciación masiva

Para las infecciones experimentales, se inocularon ratones BALB/c intranasalmente con  $10^5$  unidades formadoras de placa (ufp) de los virus SARS-CoV-wt o SARS-CoV- $\Delta$ E o bien con una solución de medio sin virus, como control negativo de infección (*mock*), y se sacrificaron a los 2 y 4 días después de la infección (ddi) para la recogida de muestras de sangre y de pulmón. A lo largo del experimento se hizo un seguimiento de los síntomas clínicos de la enfermedad, entre ellos la pérdida de peso

(Fig. 5A). Como se esperaba, los ratones infectados con el SARS-CoV- $\Delta$ E mantuvieron su peso inicial, al igual que los ratones no infectados, mientras que los infectados con el virus silvestre adaptado a ratón disminuyeron su peso a lo largo de los días hasta alcanzar el 80% del peso inicial el día 4 di. La determinación de virus en los pulmones mostró que el título viral a día 2 fue algo mayor que a día 4 después de la infección (Fig. 5B), probablemente como consecuencia del aclaramiento del virus por la respuesta inmune del hospedador, de acuerdo con resultados previos de nuestro laboratorio (Jimenez-Guardeño y col., 2014). Además, el título del virus SARS-CoV- $\Delta$ E en el pulmón fue unas 100 veces menor que el del virus silvestre, tanto a día 2 como a día 4 di. De forma similar, los niveles de gRNA viral a 2 ddi eran mayores que a día 4 (Fig. 5C). Además, no se observaron diferencias en los niveles de gRNA entre el virus SARS-CoV-wt y el SARS-CoV- $\Delta$ E, indicando que ambos virus son competentes en replicación y que la ausencia de la proteína E, que es parte de la envuelta viral, estaría afectando a la morfogénesis del virus y, en consecuencia, a su propagación, como se ha descrito en otros coronavirus (Almazan y col., 2013; DeDiego y col., 2008; Ortego y col., 2007). A 4 ddi, a pesar de la reducción en el título viral se observó macroscópicamente un aumento en el daño pulmonar, asociado al incremento de peso del pulmón (Fig. 5D) y caracterizado por edema y áreas hemorrágicas, fundamentalmente en la infección por el virus silvestre SARS-CoV-wt (Fig. 5E). Estas observaciones confirman que la patología pulmonar no se debe únicamente al efecto directo de la replicación viral, sino a una respuesta inflamatoria exacerbada que avanzaba a pesar del aclaramiento del virus (Jimenez-Guardeño y col., 2014), causando finalmente la muerte de los animales infectados (Fig. 5A). El estudio histopatológico confirmó que los pulmones de los ratones infectados con el SARS-CoV- $\Delta$ E mostraban menos signos de inflamación que los infectados con el virus silvestre, en los que se observó daño alveolar difuso con edema pronunciado, acumulación de exudado inflamatorio en los espacios aéreos y abundantes infiltrados de células inflamatorias, signos característicos del síndrome de dificultad respiratoria o ARDS (Fig. 5F).

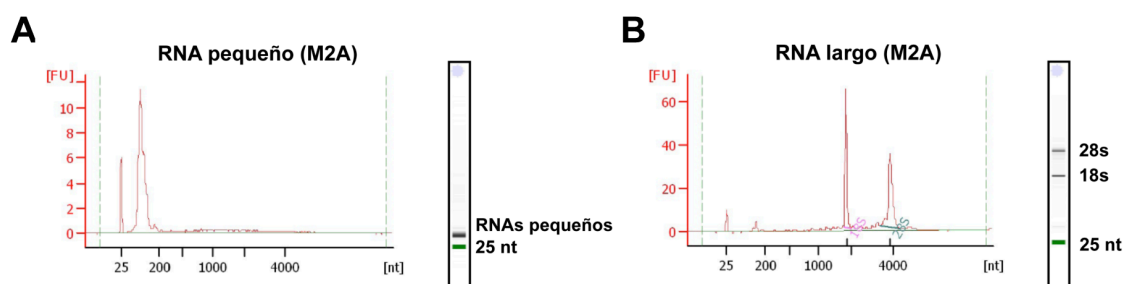


**Figura 5. Caracterización de la infección de ratones con el virus virulento SARS-CoV-wt o el virus atenuado SARS-CoV-ΔE.** Ratones BALB/c de 16 semanas se inocularon con  $10^5$  ufp del virus silvestre (WT) o del mutante sin la proteína E (ΔE). Se realizó un seguimiento a lo largo de 4 días después de la infección midiendo pérdida de peso del ratón (A), título viral (B), niveles de RNA genómico del virus (C),

## Resultados

aumento del peso de los pulmones (D), lesiones macroscópicas de los pulmones (E), e histopatología pulmonar (F). (A) La pérdida de peso se representa como porcentaje del peso de los ratones respecto al que tenían al inicio del experimento, antes de la infección con el virus. (B) Título viral en los pulmones de ratones sacrificados a 2 y 4 ddi expresado como ufp por gramo de tejido pulmonar. (C) Niveles de RNA genómico viral en los pulmones de ratones infectados, medidos por RT-qPCR y representados como el incremento respecto a los niveles en ratones no infectados, que se usaron como referencia con un valor de 1. (D) Peso del pulmón de ratones infectados expresado respecto al de los ratones no infectados a los que se asignó el valor relativo de 100%. El incremento en el peso del pulmón está directamente relacionado con el flujo de líquido desde los vasos sanguíneos hacia los espacios alveolares e intersticiales, acompañando a las células de la respuesta inflamatoria que acuden al foco de la infección. (E) Aspecto de los pulmones de ratón. La infección viral causa lesiones hemorrágicas de color rojo intenso. (F) Análisis histopatológico de los pulmones de ratones infectados. Secciones pulmonares se tiñeron con hematoxilina-eosina y se observaron al microscopio (10x). Los asteriscos (\*) indican edema y las flechas, infiltrados celulares inflamatorios.

Una vez comprobado que las infecciones experimentales de ratones se habían desarrollado como se preveía, en términos de crecimiento viral y virulencia, se extrajo el RNA de los pulmones y se fraccionó de acuerdo con su tamaño en RNAs pequeños (< 200 nt) y RNAs de mayor tamaño (> 200 nt). Se confirmó mediante un sistema de bioanálisis (*Agilent Bioanalyzer*) que ambas muestras de RNA cumplían con los requisitos mínimos de calidad y cantidad que se requieren para la secuenciación masiva. Este sistema de análisis permite medir la calidad de una muestra de RNA a través del cálculo del índice de integridad del RNA (RIN), que se determina mediante el análisis microelectroforético de la muestra y la cuantificación de productos de degradación. En los RNAs mayores de 200 nt, la desintegración del RNA se observa como reducción en la intensidad de señal de los RNA ribosómicos (28s y 18s) y aumento de la señal de RNAs de menor tamaño. Los valores de RIN varían entre 10, RNA intacto, y 1, completamente degradado. De forma independiente, se determina la concentración de la muestra para estandarizar el valor de la integridad. En todas las muestras de pulmón, ambas fracciones de RNAs pequeños (Fig. 6A) y largos (Fig. 6B) dieron valores de integridad del RNA superiores a 8 y concentraciones adecuadas (37-116 ng/μl para los RNAs pequeños y 68-256 ng/μl para los RNAs largos) para asegurar resultados óptimos en la secuenciación masiva.



**Figura 6. Análisis de la integridad del RNA de los pulmones de ratones infectados.** El RNA de los pulmones de los ratones infectados se fraccionó separando los RNAs pequeños (< 200 nt) de los largos (> 200 nt). Su concentración y calidad se analizó en el *Bioanalyzer* antes de la secuenciación.

Electroferogramas de las fracciones de RNAs pequeños (A) y largos (B) de una muestra representativa (M2A, ratones no infectados a 2 ddi). (A) El pico mayoritario está por debajo de los 200 nt, confirmando la buena separación de los RNAs de pequeño tamaño. El pico de 25 nt corresponde al marcador de tamaño utilizado como referencia. No se observa una degradación evidente de RNA en el gel mostrado a la derecha. (B) Los dos picos mayoritarios corresponden al RNA ribosomal 18s y 28s, cuyas bandas se observan en el gel capilar de la derecha. El índice de integridad del RNA (RIN) se calcula comparando la cantidad de RNA de los dos picos respecto al total de RNA de la muestra. El RIN de esta muestra fue 9,3.

## 1.2. Secuenciación masiva de los RNAs de pulmones infectados por SARS-CoV

La secuenciación masiva de los RNAs de pequeño tamaño se realizó en una compañía internacional de referencia en servicios de genómica (BGI, China). Se analizaron un total de 16 muestras que incluían: dos réplicas biológicas de pulmones no infectados y tres réplicas biológicas de los pulmones infectados con SARS-CoV-wt o SARS-CoV-ΔE para cada uno de los tiempos de infección (2 y 4 ddi). Se aplicó el protocolo de la compañía Illumina para secuenciación de RNAs pequeños (*Small RNA Sample Preparation Kit*, Illumina). Se obtuvieron lecturas de hasta 50 nt de una única polaridad (*single end*), es decir, leídas una sola vez y de polaridad original conocida. La polaridad de los RNAs originales se pudo conocer debido a que los adaptadores unidos a los extremos del RNA proporcionan lecturas etiquetadas por nt diferentes si corresponden al RNA original o a su secuencia complementaria. De cada muestra se obtuvieron alrededor de 30 millones de lecturas (Tabla VII), identificándose secuencias de RNAs pequeños mayoritarios en el tejido pulmonar, como el miRNA de *Mus musculus* mmu-let-7, además de otros RNAs minoritarios.

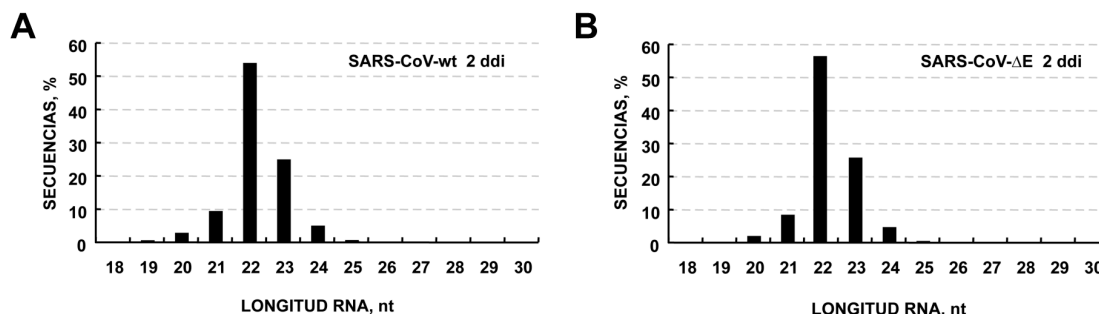
Tabla VII. Análisis de las secuencias de RNAs pequeños de los pulmones de ratones infectados con SARS-CoV-wt o SARS-CoV-ΔE obtenidas por secuenciación masiva.

Virus	Muestra	Lecturas totales	<i>Mus musculus</i>			SARS-CoV			
			% Alineamiento	Secuencias únicas	% en locus	Secuencias únicas	% Secuencias únicas	Alineamiento en '+'	Alineamiento en '-'
Mock	M2A	23.884.319	95,7	8.630.365	98,0	6	0,000025	3	3
	M2B	27.303.339	96,8	8.593.113	99,3	10	0,000037	9	1
	M4A	33.415.397	92,9	10.994.441	99,5	2	0,000006	2	0
	M4B	35.475.495	93,6	10.475.978	99,3	3	0,000008	3	0
SARS-CoV-WT	W2B	26.654.841	94,2	8.542.678	97,3	23,162	0,086896	22.130	1.032
	W2C	27.184.034	93,7	9.158.509	98,5	12,903	0,047465	12.538	365
	W2E	26.781.614	94,1	8.894.733	98,5	6,243	0,023311	6.036	207
	W4A	43.414.553	91,6	11.403.608	98,7	965	0,002223	896	69
	W4C	39.869.924	92,3	12.054.623	98,1	1,802	0,004520	1.671	131
	W4D	38.540.129	91,8	11.375.245	98,2	1,055	0,002737	956	99
SARS-CoV-ΔE	E2A	27.103.824	95,3	8.994.266	99,2	1,614	0,005955	1.570	44
	E2C	23.453.282	94,9	7.932.378	99,3	2,284	0,009739	2.242	42
	E2D	28.487.512	95,5	9.876.185	99,2	1.861	0,006533	1.826	35
	E4A	37.210.956	93,5	12.056.393	99,2	26	0,000070	26	0
	E4B	43.185.090	93,4	14.064.987	99,2	476	0,001102	451	25
	E4E	32.952.359	93,5	10.581.233	98,9	472	0,001432	439	33

## Resultados

Se indican los ratones no infectados (Mock-infectados, M), infectados con el SARS-CoV-wt (W) o SARS-CoV- $\Delta$ E (E). Los números 2 y 4 en el nombre abreviado de las muestras indican 2 y 4 ddi, respectivamente. Las letras A, B, C, D y E indican réplicas biológicas independientes. Secuencias únicas, aquellas que tienen un solo alineamiento en el genoma de referencia. *Locus*, secuencias que alinean de acuerdo con la definición de *loci* descrita en Materiales y Métodos. Alineamiento en '+' o '-', secuencias que alinean con el RNA viral en polaridad positiva (la misma del gRNA) o negativa, respectivamente.

La calidad de las librerías preparadas para la secuenciación masiva se comprobó analizando la distribución de la longitud de las secuencias obtenidas. Las lecturas de longitud menor a 18 nt se excluyeron del análisis, porque corresponden a artefactos de la secuenciación (lecturas incompletas, dimerización de adaptadores,...). En todas las muestras, más del 50% de las lecturas tenían 22 nt de longitud (Fig. 7), que es el tamaño característico de los miRNAs expresados en células de mamífero, lo que confirmó que los resultados de la secuenciación tenían una calidad óptima. Los miRNAs fueron los más abundantes en la secuenciación, dado que en la célula representan el mayor porcentaje de todos los RNAs de pequeño tamaño (Peng y col., 2011). Además, alrededor del 25% de las secuencias tenían 23 nt de longitud y podrían corresponder a miRNAs adenilados en el extremo 3'. Esta es una modificación frecuente de los miRNAs para aumentar su estabilidad frente a exonucleasas celulares que degradan miRNA maduros no unidos a sus dianas (Kai y Pasquinelli, 2010).



**Figura 7. Distribución de la longitud de las secuencias obtenidas por secuenciación masiva de los RNAs pequeños de pulmones de ratones infectados.** Se representa el porcentaje de secuencias que tienen longitudes entre 18 y 30 nt, obtenidas a partir de RNAs pequeños de los ratones infectados con el SARS-CoV-wt (A) o con el mutante  $\Delta$ E (B) a 2 ddi. Estas muestras son representativas de todas las demás. En todos los casos, más del 50% de las secuencias tenía 22 nt, coincidiendo con la longitud de los miRNAs en células de mamífero.

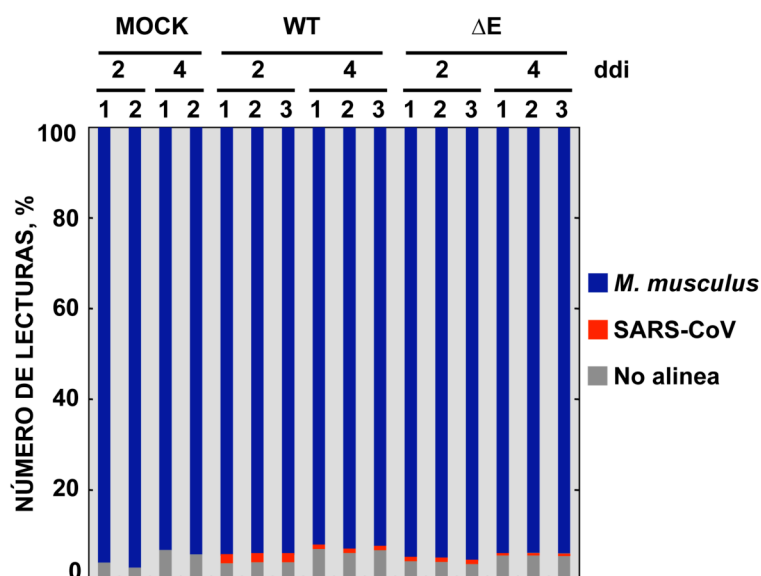
Los RNAs de mayor tamaño procedentes de los pulmones infectados se analizaron por secuenciación masiva para obtener el transcriptoma completo (RNA-seq). Para mejorar la eficiencia del análisis se eliminó el RNA ribosómico, que representa el 80-90% del RNA total de mamíferos (Lodish y col., 2000), utilizando sondas específicas unidas a partículas magnéticas (*Ribozero rRNA Removal kit*). De esta forma, las muestras se enriquecen en los RNAs de interés menos abundantes, que corresponden en su mayoría a mRNAs y lncRNAs. Estos RNAs proporcionan información sobre la

respuesta del hospedador a la infección, mediada tanto por la expresión de proteínas como de RNAs no codificantes con función reguladora. Para la construcción de las librerías, los RNAs se fragmentaron, se copiaron a cDNAs y a estos se les añadieron adaptadores a los extremos para poder identificar la polaridad de las secuencias de RNA originales a partir de las lecturas obtenidas en la secuenciación. De cada muestra, se obtuvieron alrededor de 20 millones de lecturas únicas de hasta 100 nt leídas en un único sentido.

### **1.3. Alineamiento de las secuencias de RNAs pequeños con genomas de referencia**

Las secuencias con más de 18 nt obtenidas por secuenciación masiva de los RNAs pequeños de los pulmones de ratones infectados con SARS-CoV se alinearon con el genoma del hospedador (ratón GRCm38) o con el genoma del SARS-CoV-MA15 mediante el programa de alineamiento *BWA*. Para aumentar la fiabilidad del alineamiento y evitar secuencias erróneas debidas a cambios de nts durante la secuenciación, se aplicaron dos criterios: (i) Permitir como máximo un nt no coincidente entre la lectura obtenida y la secuencia de referencia, sin admitir inserciones o deleciones; (ii) Descartar todas aquellas secuencias que alineaban en más de un sitio del genoma, seleccionando exclusivamente las secuencias únicas.

Más del 90% de las secuencias alinearon con el genoma del ratón (Fig. 8) en todas las muestras de pulmón, tanto no infectados como infectados con el virus silvestre o con el mutante de deleción de la proteína E, a ambos tiempos después de la infección (2 y 4 ddi) (Tabla VII). Parte de estos RNAs celulares pequeños eran productos de degradación de RNAs, pero otros correspondían a distintos tipos de RNAs pequeños con relevancia funcional como miRNAs, tRNAs, snRNAs, snoRNAs o piRNAs. Por otra parte, en las muestras de ratones infectados, alrededor del 0,1% de las secuencias alinearon específicamente con el genoma del virus, mientras que estas secuencias fueron prácticamente indetectables en los pulmones no infectados (Tabla VII). El 5% de las secuencias no alinearon ni con el genoma del ratón ni con el del virus y se consideraron ruido experimental, debido probablemente a errores introducidos en la secuenciación, por lo que no se tuvieron en cuenta en posteriores análisis (Datta y col., 2010) (Fig. 8).



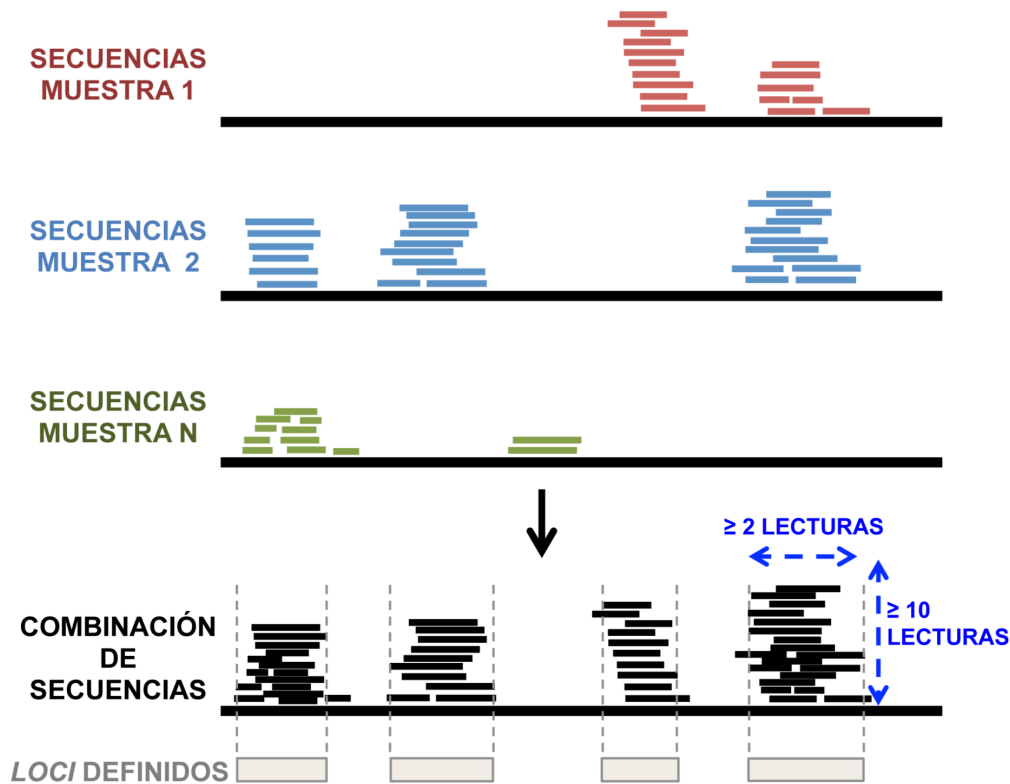
**Figura 8. Alineamiento de las secuencias de RNA de pequeño tamaño de los pulmones de ratones infectados obtenidas por secuenciación masiva.** Las lecturas con más de 18 nt se alinearon con el genoma de ratón (GRCm38) usando el programa de alineamiento *BWA* permitiendo como máximo 1 nt no coincidente y descartando aquellas lecturas que alineaban en más de una posición en el genoma. La gráfica representa el porcentaje de lecturas que alinearon con el genoma del ratón (*Mus musculus*) o con el genoma del virus (SARS-CoV) en cada una de las muestras del experimento. Mock, RNA de ratones no infectados; WT, RNA de ratones infectados con el virus SARS-CoV-wt; ΔE, RNA de ratones infectados con el virus SARS-CoV-ΔE. Los números (1, 2 y 3) sobre cada columna indican las réplicas biológicas de cada condición experimental.

### 1.3.1. Definición de *loci* o posiciones de alineamiento de RNAs pequeños en el genoma de ratón

Para el análisis comparativo de las secuencias de RNAs pequeños fue imprescindible definir entidades de secuencia correspondientes a un RNA pequeño con relevancia biológica frente al ruido experimental. Para ello, se combinaron las secuencias obtenidas en todas las muestras en un único alineamiento virtual con el genoma de referencia (Fig. 9). Se definieron como *locus* las posiciones del genoma en las que al menos en una de las muestras alineaban un mínimo de diez lecturas de RNA con una cobertura mínima de dos lecturas para cada uno de los nt del *locus*. Con estos criterios, se obtuvieron 5.208 *loci* en el genoma del ratón que incluían en torno al 98% del total de las secuencias de RNA (Tabla VII). Esta clasificación permitió cuantificar el número de lecturas que correspondían a los distintos *loci* para comparar su expresión entre las distintas muestras. De los 5.208 *loci*, 593 correspondieron a miRNAs de ratón anotados en *miRBase*, y representaban el 29% del total de 2.035 miRNAs anotados. De acuerdo con esta base de datos, se han descrito 427 miRNAs que se expresan en el pulmón de ratón (GEO: GSM539870), de los que 288 (51,3%) fueron detectados en nuestro análisis. Esto significaría que nuestros resultados



experimentales podrían incluir miRNAs de otras células no pulmonares, como células del sistema inmune infiltradas, o bien miRNAs no identificados antes en el pulmón.

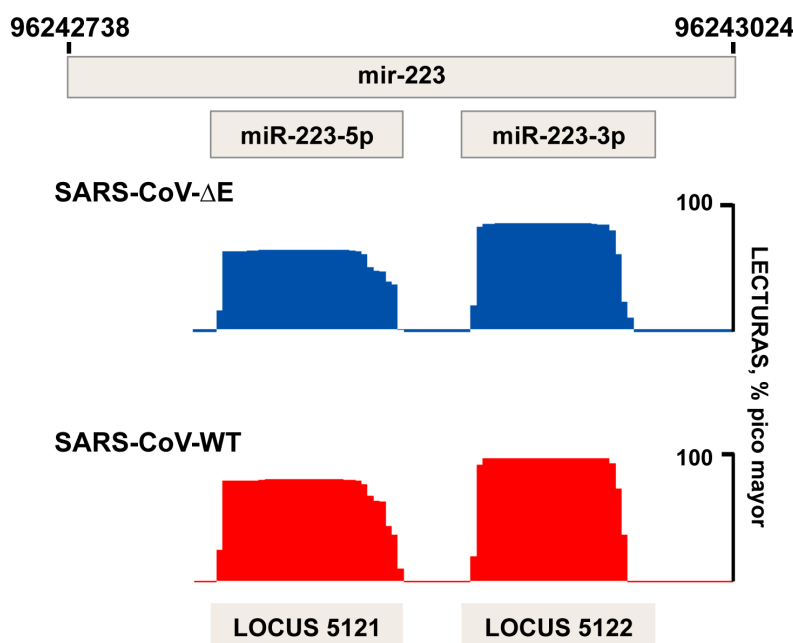


**Figura 9. Definición de *locus* a partir de las secuencias obtenidas por secuenciación masiva.** Para comparar las secuencias diferencialmente expresadas en los pulmones de ratones infectados con el virus, o sin infectar, se establecieron los criterios mínimos para determinar a qué posiciones del genoma o *locus* se asignaban las secuencias obtenidas en la secuenciación. Se alinearon virtualmente las secuencias de todas las muestras con el genoma de referencia y se combinaron para generar un conjunto único de datos. Se obtuvieron en total 5.208 *loci* definidos como regiones genómicas con una cobertura continua de al menos 2 lecturas y una abundancia mínima de 10 lecturas en alguna de las muestras. Se calcularon las lecturas que se encontraban en todos estos *loci* en cada muestra usando la función *featureCounts* del programa *Rsubread*.

### 1.3.2. Visualización de los alineamientos de RNAs pequeños con el genoma

La visualización del alineamiento de secuencias de RNAs pequeños con el genoma de referencia proporciona información de interés como: (i) La posición del genoma en la que alinean las secuencias y todas las anotaciones asociadas (genes, secuencias codificantes o reguladoras,...) lo que permite asignar los *loci* definidos anteriormente; (ii) Número de lecturas que alinean en cada *locus* del genoma en cada muestra; (iii) Polaridad de las secuencias, es decir, si las secuencias tienen el mismo sentido del genoma o contrario; (iv) Cambios en la secuencia de nt respecto al genoma de referencia (Fig. 10). La visualización de los alineamientos permitió identificar secuencias de miRNAs (Fig. 10) que se caracterizan por una distribución bimodal en dos *loci* próximos (separados unos 20 nt) con distinta abundancia de lecturas, que

corresponden al miRNA maduro (el más abundante) y al miRNA pasajero. Esta distribución refleja la estructura del RNA precursor de miRNAs, formada por un lazo-tallo con dos secuencias complementarias (Burke y col., 2015).



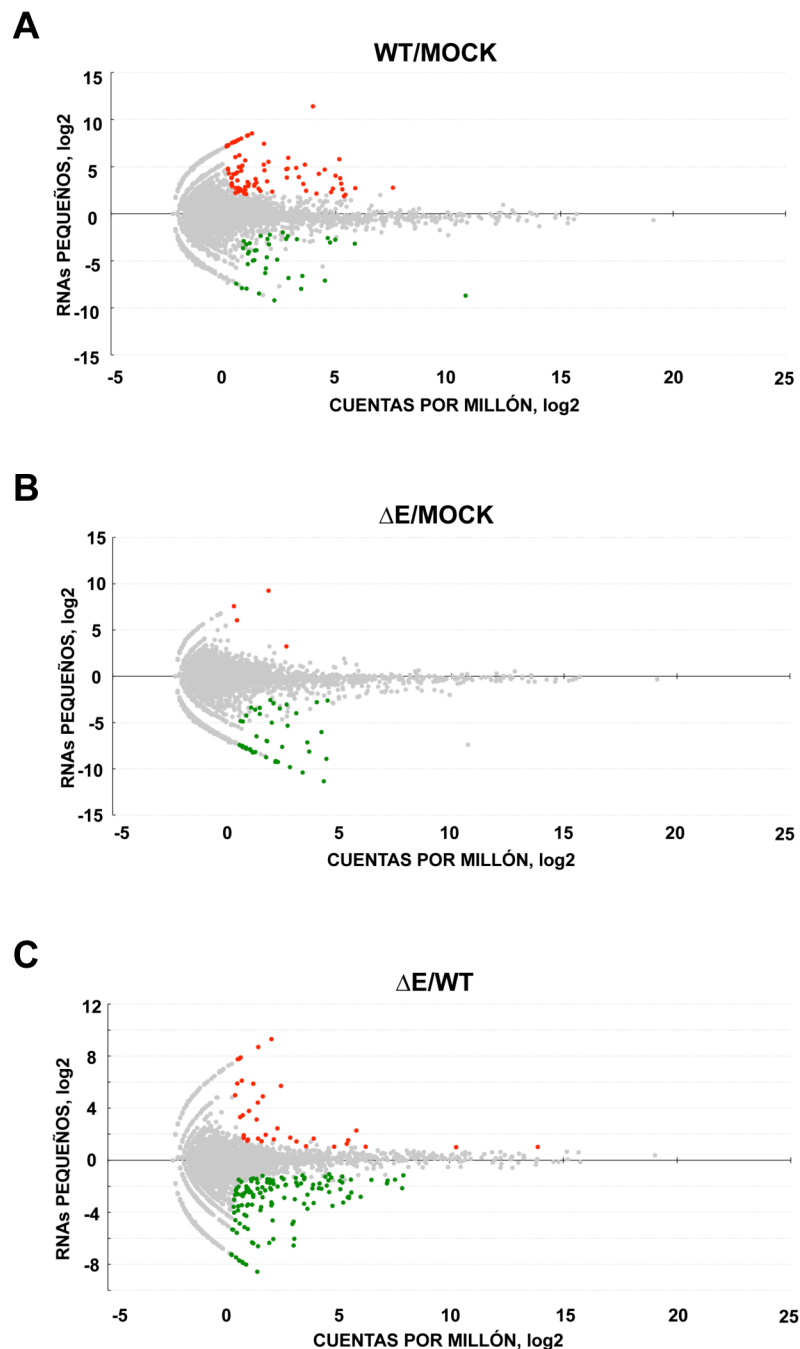
**Figura 10. Visualización del alineamiento de las lecturas de las secuenciación masiva con el genoma del ratón.** Visualización con el programa *Seqmonk* del alineamiento de secuencias con dos *loci* (5121 y 5122) del genoma de referencia. La distribución bimodal de ambas secuencias y la distinta abundancia indican que corresponden a los brazos 5p y 3p del precursor del miRNA-223, que dan lugar al miRNA pasajero y miRNA maduro, respectivamente. Los picos azules corresponden a una muestra de pulmón infectado con el SARS-CoV-ΔE a 2 ddi y los picos rojos, a una infectada con el virus wt.

## 2. EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE RNAs PEQUEÑOS DE RATÓN (miRNAs) EN PULMONES DE RATONES INFECTADOS CON EL VIRUS SARS-CoV VIRULENTO O ATENUADO

### 2.1. Parámetros que definen la expresión diferencial de RNAs pequeños

Una vez asignadas las secuencias de RNAs pequeños a *loci* del genoma de referencia, se analizó su expresión diferencial en el pulmón de ratones infectados con el SARS-CoV wt virulento y el mutante ΔE atenuado. Los RNAs pequeños expresados diferencialmente podrían estar implicados en la inflamación severa causada por el virus virulento. Se hicieron comparaciones pareadas de la expresión en el pulmón de los RNAs pequeños entre (i) la infección con el virus virulento (2 ddi) y no infección (wt/mock) (Fig. 11A); (ii) infección con el virus atenuado (2 ddi) y no infección (ΔE/mock) (Fig. 11B) y; (iii) infección con el virus atenuado y el virulento (ΔE/wt) (Fig. 11C). El cociente entre el número de lecturas de un mismo RNA en cada condición se expresó como log2. Cuanto mayor sea este cociente, tomado en valor absoluto, más significativa será la diferencia de expresión y más probable es que ese RNA sea relevante en la patogénesis de SARS-CoV (Fig. 11). Entre los RNAs expresados

diferencialmente ( $|\log_2\text{Ratio}| \geq 1$ ) con significancia estadística ( $\text{FDR} \leq 0,05$ ) (puntos coloreados en Fig. 11), se observó que existía una correlación inversa entre la magnitud de la variación y la abundancia de lecturas. La mayoría de los RNAs que cambiaban más su expresión eran también los menos abundantes, y por lo tanto, su relevancia en la interacción virus-hospedador sería menos significativa (Ameres y Zamore, 2013). Por eso, el estudio posterior se centró en aquellos RNAs pequeños que cambiaban su expresión significativamente (más de 2 veces) durante la infección y eran más abundantes ( $\geq 20$  cuentas sin procesar o *raw counts* en promedio).



**Figura 11.** Expresión diferencial de RNAs pequeños en pulmones de ratones infectados con el virus virulento o con el atenuado. El valor de expresión de cada uno de los *loci* se comparó entre las

muestras de los ratones no infectados (mock), o infectados con el SARS-CoV-wt (WT) o SARS-CoV-ΔE (ΔE) a 2 ddi. (A) Comparación de la expresión en ratones infectados con el virus virulento wt a 2 ddi respecto a no infectados. (B) Comparación de la expresión en ratones infectados con el virus atenuado ΔE a 2 ddi respecto a no infectados. (C) Comparación de la expresión en ratones infectados con el virus atenuado ΔE a 2 ddi respecto a infectados con el virus virulento wt a 2 ddi. Cada punto en las gráficas representa un *locus*, definido como se ha explicado en la Figura 9. En el eje horizontal se representa el número de lecturas de cada *locus* por cada millón de lecturas en el pulmón de las muestras que se comparan en cada caso en escala logarítmica de base 2 (cpm). En el eje vertical se representa la expresión diferencial de cada *locus* expresado como el log2 ratio del cociente (o *fold-change*, FC). Todos los puntos con color están diferencialmente expresados con significancia estadística (FDR ≤0,05, FC≥2 o FC≤-2 y una media de cuentas sin procesar ≥20) usando tres réplicas biológicas por grupo. En rojo, *loci* con FC≥2; en verde, *loci* con FC≤-2.

## 2.2. Búsqueda de miRNAs diferencialmente expresados anotados en bases de datos

Se estudió la naturaleza de los RNAs pequeños diferencialmente expresados mediante su búsqueda en la base de datos de miRNAs, *miRBase*. Sólo una pequeña proporción de estos RNAs pequeños se identificó como miRNA de ratón anotado: 7/127 en la infección con el virus wt respecto a no infección (Tabla VIII) y 23/190 en la infección con el virus ΔE respecto al virus wt (Tabla IX), de forma similar a lo observado en ratones infectados con SARS-CoV o el virus de la gripe (Peng y col., 2011). Los RNAs diferencialmente expresados que no eran miRNAs anotados incluían otros tipos de RNAs pequeños, como RNAs nucleolares, cuya función en la infección viral no se conoce todavía (Peng y col., 2011). Además, se incluirían potenciales miRNAs nuevos, dada la distribución bimodal de lecturas observada en el alineamiento con el genoma de ratón, similar a la esperada para los precursores de miRNAs.

Tabla VIII. miRNAs de ratón diferencialmente expresados en los pulmones de ratones infectados con el virus virulento SARS-CoV wt a 2 ddi respecto a no infectados.

miRNA	Fold-change	CPM	
		wt	mock
mmu-miR-206-3p	-413,41	85,925	35486,926
mmu-miR-328-3p	-6,78	12,126	82,139
mmu-miR-383-5p	-6,35	1,542	9,815
mmu-miR-543-3p	-3,98	3,127	12,424
mmu-miR-532-5p	4,04	86,222	21,250
mmu-miR-5099	4,89	61,181	12,510
mmu-miR-6978-5p	18,22	5,796	0,318

Se muestran los miRNAs con expresión diferencial o *fold-change* ≥2 o ≤-2, FDR≤0,05 y un promedio de lecturas sin procesar en la secuenciación masiva de los RNAs pequeños mayor de 20. Mock, ratones no infectados. CPM, cuentas por millón de los miRNAs en la comparación de los ratones no infectados e infectados con el SARS-CoV-wt.

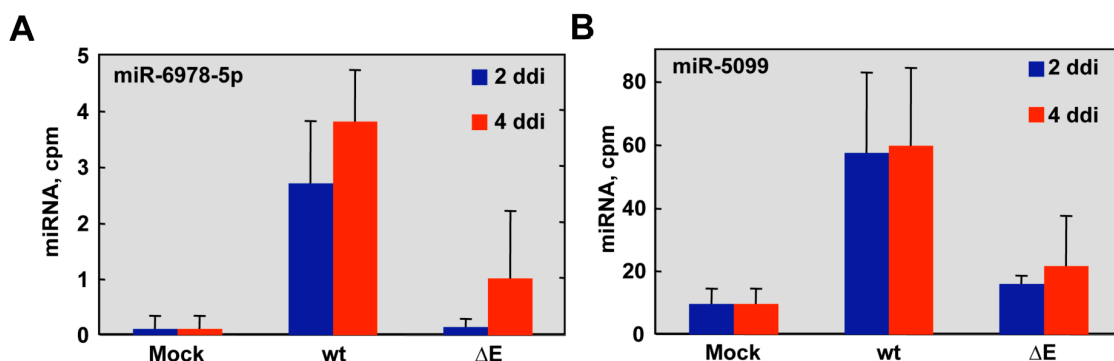
Tabla IX. miRNAs de ratón diferencialmente expresados en los pulmones de ratones infectados con el virus atenuado SARS-CoV- $\Delta$ E respecto al virulento SARS-CoV wt a 2 ddi.

miRNA	Fold-change	CPM	
		$\Delta$ E	wt
mmu-miR-6978-5p	-14,39	6,255	0,434
mmu-miR-331-3p	-3,27	17,448	5,333
mmu-miR-5099	-2,99	63,119	21,112
mmu-miR-33-5p	-2,98	269,660	90,824
mmu-miR-223-3p	-2,85	161,456	56,689
mmu-miR-296-5p	-2,64	4,257	1,613
mmu-miR-223-5p	-2,43	36,504	15,032
mmu-miR-3102-3p	-2,40	60,969	25,457
mmu-miR-145a-5p	-2,23	377,413	168,897
mmu-miR-107-3p	2,01	891,444	1782,888
mmu-miR-320-3p	2,02	10623,710	21395,207
mmu-miR-150-3p	2,05	56,103	115,360
mmu-miR-30c-1-3p	2,06	21,407	44,017
mmu-miR-760-3p	2,11	9,000	19,027
mmu-miR-351-3p	2,39	29,243	70,035
mmu-miR-3474	2,72	5,938	16,111
mmu-miR-5107-5p	2,73	2,035	5,560
mmu-miR-877-5p	2,88	27,761	80,171
mmu-miR-378d	3,17	9,254	29,243
mmu-miR-128-3p	3,29	1,079	3,555
mmu-miR-3572-5p	3,31	4,423	14,672
mmu-miR-483-5p	3,88	1,932	7,516
mmu-miR-184-3p	4,86	27,474	133,436

Se muestran los miRNAs con expresión diferencial o *fold-change*  $\geq 2$  o  $\leq -2$ ,  $FDR \leq 0,05$  y un promedio de lecturas sin procesar en la secuenciación masiva de los RNAs pequeños mayor de 20. CPM, cuentas por millón de los miRNAs en la comparación de los ratones infectados con el SARS-CoV-wt y el SARS-CoV- $\Delta$ E

Entre los miRNAs anotados, solo dos (mmu-miR-5099 y mmu-miR-6978-5p) se expresaron diferencialmente tanto en la infección del virus virulento respecto a sin infección, como en la infección del virus atenuado respecto al virulento (Fig. 12). Ambos miRNAs se sobre-expresaban en la infección con el virus virulento (Tablas VIII y IX), sugiriendo una posible relación con la inflamación severa que induce el SARS-CoV en los pulmones de los ratones infectados. De hecho, el miR-5099 se ha relacionado con procesos inflamatorios crónicos asociados a cáncer en ratones (Bao y col., 2014). Otros cinco miRNAs se expresaron diferencialmente en la infección con el virus virulento respecto a sin infección, pero no variaron con respecto a la infección con el virus atenuado, por lo que podrían relacionarse con la respuesta a la infección por SARS-CoV, con independencia de la proteína E. Por otra parte, los 21 miRNAs cuya expresión solo variaba en la infección con el virus atenuado respecto al virulento,

estarían asociados a los efectos causados en el pulmón por la presencia de la proteína E.

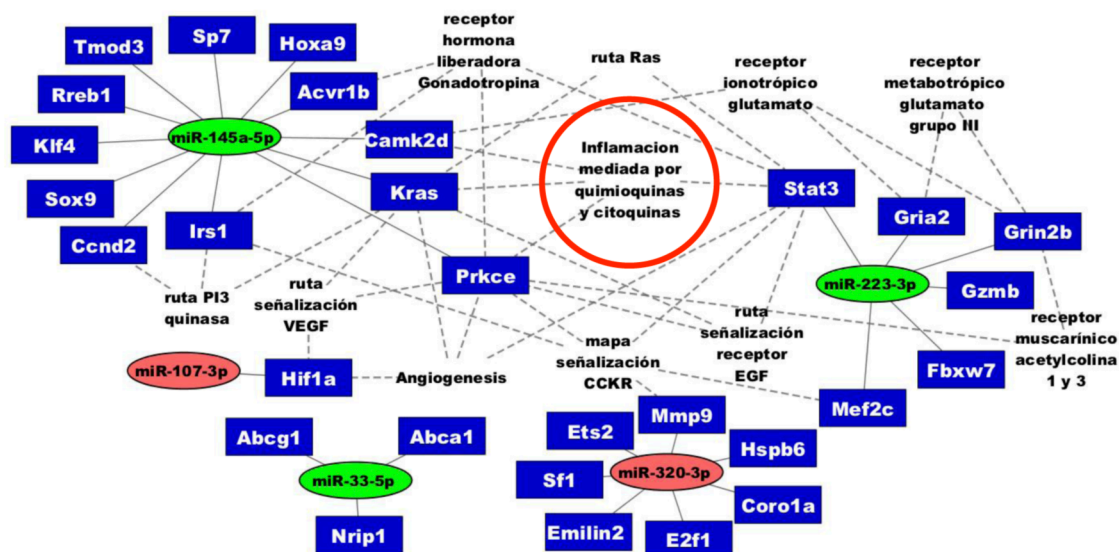


**Figura 12. Expresión de miRNAs diferencialmente expresados en los pulmones de ratones infectados con el virus SARS-CoV atenuado y virulento.** Número de lecturas por millón de secuencias (cpm) obtenidas por secuenciación masiva de los miRNAs miR-6978-5p (A) y miR-5099 (B) en los pulmones de los ratones no infectados (mock) o infectados con el virus virulento SARS-CoV-wt (WT) y atenuado SARS-CoV-ΔE (ΔE) a días 2 y 4 después de la infección.

### 2.3. Búsqueda de potenciales mRNAs diana para los miRNA diferencialmente expresados

Los programas de búsqueda de dianas de miRNAs disponibles actualmente requieren la anotación previa de los miRNAs. Por tanto, la búsqueda de mRNAs diana para los RNAs pequeños diferencialmente expresados solo pudo realizarse con los miRNAs de ratón anotados. Se buscaron los mRNAs dianas potenciales para los miRNAs anotados y diferencialmente expresados en la infección con el virus atenuado respecto al virulento a 2 ddi (Tabla IX) con el programa *miRTarBase* (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/search.php#advanced>). *A priori*, estas dianas podrían estar relacionadas con la inflamación pulmonar severa causada por el virus virulento, a diferencia del virus atenuado.

De los miRNAs regulados positiva (14) o negativamente (9) en la infección con el virus ΔE respecto a wt, se seleccionaron únicamente los que estaban validados experimentalmente por distintas técnicas (análisis de la represión de genes marcadores, *western blot* o qPCR): miR-107-3p y miR-320-3p, sobre-expresados; y miR-145a-5p, miR-33-5p y miR-223-3p, con niveles de expresión reducidos. La búsqueda bioinformática proporcionó 8 mRNAs diana potenciales para los 2 miRNAs sobre-expresados y 21 para los 3 miRNAs que redujeron su expresión (Fig. 13) (Manuscrito en preparación).



**Figura 13. Red de interacciones de los miRNAs, genes diana y rutas funcionales reguladas durante la infección del SARS-CoV atenuado y virulento.** Los miRNAs anotados diferencialmente expresados ( $FDR \leq 0,05$ ,  $FC \geq 2$  o  $FC \leq -2$  y una media de cuentas sin procesar  $\geq 20$ ) en la infección con el virus atenuado y virulento a 2 ddi y sus mRNAs diana validados experimentalmente (programa *miRTarBase*) se representan dentro de óvalos y rectángulos, respectivamente, unidos por líneas continuas. Los genes diana y las rutas funcionales significativamente enriquecidas ( $p\text{-valor} < 0,1$ ) para los mismos (programa *Panther*) se conectan entre sí por líneas discontinuas. El círculo rojo indica la ruta de señalización celular relacionada con inflamación mediada por citoquinas. La representación gráfica se ha realizado con el programa *Cytoscape*.

#### 2.4. Función de los potenciales mRNAs diana de los miRNAs diferencialmente expresados

Para relacionar funcionalmente los mRNAs diana potenciales de los miRNAs, estos se analizaron con el programa *Panther* (<http://pantherdb.org>) que clasifica funcionalmente los genes en rutas de señalización celulares. Se seleccionaron los 11 grupos funcionales estadísticamente significativos ( $p\text{-valor} < 0,1$ ) para establecer una red de interacciones entre estas funciones, los miRNAs y sus dianas (Fig. 13). Las interacciones resultantes se integraron en una red compleja, en la que un mismo gen diana podía participar en varias vías metabólicas. Por ejemplo, los genes *Prkce*, *Kras* o *Stat3* pertenecen a 6 o 7 grupos funcionales, todos ellos implicados en procesos inflamatorios o en rutas que regulan la transcripción de genes de respuesta a estrés. Dos de los miRNAs reprimidos en la infección con el virus atenuado respecto al virulento, miR-145a-5p y miR-223-3p, tienen dianas potenciales relacionadas con la inflamación a través de las rutas de señalización de inflamación mediada por quimioquinas y citoquinas, del receptor de colecistoquinina (CCKR) y de la hormona liberadora de gonadotropina (GNRH). La ruta inducida por el receptor CCKR activa a su vez la quinasa p38-MAPK (Dufresne y col., 2006), que promueve la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y también es inducida por la proteína E del SARS-CoV durante la infección (Jimenez-Guardeño y col., 2014). Por otra parte, la vía de

señalización de la hormona GNRH se estimula por las citoquinas pro-inflamatorias IL-6 e IL-1 $\beta$  (Igaz y col., 2006; Kass y col., 2015), que se inducen en la infección por SARS-CoV (Nieto-Torres y col., 2014). Otras dianas potenciales de los miRNAs diferencialmente expresados intervienen en la angiogénesis inducida por mediadores de la inflamación como CCL2, TNF y macrófagos activados (Granger y Senchenkova, 2010). Varios mRNAs diana pertenecían a rutas de señalización celulares. Este es el caso de las rutas en las que intervienen el fosfoinositol 3-kinasa (PI3K), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) o Ras, formadas por quinasas que se activan en cascada y regulan la transcripción de genes de respuesta a estrés. En concreto, los factores PI3K y EGF, a través de las vías mediadas por las quinasas Akt y MAPKs, respectivamente (Vivanco y Sawyers, 2002; Zarubin y Han, 2005), activan NF- $\kappa$ B, que induce la transcripción de citoquinas pro-inflamatorias, muy relevantes en la patología pulmonar del SARS-CoV. Además, el miR-5099, sobre-expresado significativamente en la infección por el virus virulento (Fig. 12), se relacionó con 7 posibles mRNAs diana, que incluían el gen receptor del factor inhibidor de leucemia (LIFR), un miembro de la familia de receptores de citoquinas tipo I implicado en diferenciación celular, proliferación y supervivencia ([www.genecards.org](http://www.genecards.org)).

Los miRNAs diferencialmente expresados en los pulmones infectados por SARS-CoV podrían proceder del tejido pulmonar o de las células del sistema inmune infiltradas en el mismo durante el proceso inflamatorio. En ambas situaciones, los miRNAs estarían contribuyendo a la regulación de la expresión génica asociada a la respuesta frente a SARS-CoV y a su patogénesis. La compleja red reguladora formada por los miRNAs diferencialmente expresados en presencia de la proteína E y de sus mRNAs diana potenciales sugiere que la proteína E podría contribuir a la patología inflamatoria a través de miRNAs celulares que estarían participando en el proceso inflamatorio mediante distintas rutas celulares. La confirmación de la relación de los miRNAs del hospedador con la inflamación causada por SARS-CoV requiere el análisis funcional en un sistema experimental fisiológicamente significativo, como el modelo *in vivo*. Para ello, se realizó un estudio comparativo de la expresión de los miRNAs identificados en el pulmón y de sus potenciales mRNAs diana en el transcriptoma celular al infectar con el SARS-CoV.

### **2.5. Estudio comparativo de la expresión diferencial de miRNAs y RNAs largos en los pulmones de ratones infectados por SARS-CoV**

Utilizando los resultados de secuenciación masiva o RNAseq de RNAs pequeños (< 200 nt) y largos (> 200 nt), se analizó si las dianas postuladas utilizando la base de



datos *miRTarBase* para los miRNAs expresados diferencialmente cambiaban su expresión de acuerdo con el cambio en los niveles de los miRNAs. Además, se propuso encontrar nuevas dianas potenciales para los miRNAs diferencialmente expresados en la infección por SARS-CoV que no hubieran aparecido en la búsqueda con *miRTarBase*.

La expresión de los RNAs de mayor tamaño identificados en las muestras de pulmón infectadas con el virus SARS-CoV- $\Delta$ E atenuado se comparó con los RNAs detectados en la infección por el SARS-CoV silvestre (programa *DESeq2*). Los resultados de expresión relativa se visualizaron con el programa *FIESTA viewer v.1.0*, de forma que las secuencias de RNA se asignaron a un *locus* en el genoma de ratón. Esta información se asoció al número de lecturas y al cociente entre las lecturas en la infección por  $\Delta$ E y wt. El estudio integrado de los cambios en la expresión de miRNAs y mRNAs diana del pulmón validados según *miRTarBase* (Fig. 11 y Tablas IX y X) mostró que, en general, las variaciones en los mRNAs diana (Fig. 13) estaban de acuerdo con los cambios observados en los niveles de miRNAs. Así, por ejemplo, el miR-320-3p estaba sobre-expresado en la infección con el virus atenuado respecto al virulento y los niveles de sus mRNAs diana estaban en general reducidos (Fig. 13 y Tabla X), como se esperaría si el miRNA regulase negativamente su abundancia.

Las variaciones en los niveles de expresión de los mRNAs diana fueron discretos ( $FC \leq 2$ ), como se esperaba por el ajuste fino de los miRNAs sobre mRNAs diana. Solo en algunos mRNAs (IRS1, GZMB y MEF2C) se observaron diferencias más significativas en los niveles de expresión ( $FC \geq 2$  y  $FDR \leq 0,05$ , Tabla X) en la infección con el virus atenuado respecto al virulento. En particular, los mRNAs IRS1 y MEF2C, ambos relacionados con la vía de señalización CCKR (Fig. 13), se sobre-expresaron en la infección con el virus atenuado, coincidiendo con la menor expresión de los miRNAs reguladores miR-145a-5p y miR-223-3p, respectivamente. Sin embargo, el mRNA GZMB se expresó menos en la infección con el virus atenuado a pesar de que el miR-223-3p del que es diana también se expresaba menos. La aparente falta de relación entre los cambios de expresión de algunos miRNAs y sus dianas potenciales se podría explicar teniendo en cuenta que un mismo mRNA está regulado por varios miRNAs y su regulación depende de la acción combinada de todos esos miRNAs (Fig. 4) (Chi y col., 2009; Peter, 2010). Ello dificulta en ocasiones el establecimiento de una relación directa en la expresión de un mRNA y el miRNA correspondiente.

## Resultados

**Tabla X. Análisis de la expresión diferencial de mRNAs diana para miRNAs celulares diferencialmente expresados en los pulmones de ratones infectados con el virus atenuado SARS-CoV-ΔE respecto al virulento SARS-CoV wt a 2 ddi.**

mRNA	FC	FDR	DESCRIPCIÓN
HIF1A	-1,49	0,11	Subunidad alfa del factor inducible de hipoxia 1
MMP9	1,31	0,27	Metalopeptidasa de matriz 9
HSPB6	-1,37	0,41	Proteína de choque térmico relacionada con alfa cristalina B6
CORO1A	-1,15	0,56	Coronina, proteína de unión a actina 1A
E2F1	-1,07	0,88	Factor de transcripción E2F1
EMILIN2	-1,28	0,47	Microfibrilla interrelacionadora de elastina 2
SF1	-1,15	0,62	Factor de empalmamiento 1
ETS2	-1,13	0,56	Oncogen de leucemia aviar E26 homólogo 2, dominio 3'
ABCA1	1,32	0,48	Casete de unión a ATP, subfamilia A (ABC1), miembro 1
NRIP1	1,09	0,68	Proteína de interacción con receptor nuclear 1
ABCG1	1,12	0,73	Casete de unión a ATP, subfamilia G (WHITE), miembro 1
IRS1	2,77	0,0003	Sustrato del receptor de insulina 1
CCND2	-1,25	0,19	Ciclina D2
SOX9	1,03	1000	Región determinante del sexo Y (SRY) caja 9
KLF4	1,11	0,70	Factor similar a Kruppel 4 (tripa)
RREB1	1,08	0,78	Proteína de unión al elemento de respuesta a Ras 1
TMOD3	1,10	0,73	Tropomodulina 3
SP7	0	1000	Factor de transcripción 7 Sp7
HOXA9	1,10	1000	Similar a caja A9
ACVR1B	-1,03	0,95	Receptor de activina A tipo 1B
CAMK2D	-1,51	0,001	Proteína quinasa II dependiente de calcio y calmodulina, delta
KRAS	-1,21	0,17	Homólogo al oncogen del sarcoma de rata de Kirsten (v-Ki-ras2)
PRKCE	1,15	0,61	Proteína quinasa C, épsilon
STAT3	-1,40	0,13	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
GRIA2	0	1000	Receptor de glutamato ionotrópico, AMPA2 (alfa 2)
GRIN2B	1,54	1000	Receptor de glutamato ionotrópico, NMDA2B (epsilon 2)
GZMB	-6,27	0,000	Granzima B
FBXW7	1,26	0,38	Proteína con dominio WD-40 en tándem 7 veces y caja F
MEF2C	2,58	0,001	Factor potenciador de miocitos 2C

mRNAs diana predichos con *miRTarBase* para miRNAs celulares diferencialmente expresados (Tabla VIII). FC, *fold-change*.

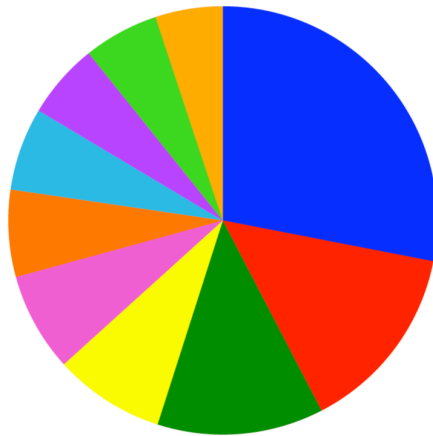
Para identificar posibles dianas nuevas de los miRNAs diferencialmente expresados se seleccionaron las secuencias de RNAs largos del pulmón, incluyendo mRNAs, que también cambiaron su expresión significativamente. Se identificaron 560 genes sobre-expresados y 503 genes regulados negativamente en los pulmones infectados con el virus atenuado ΔE respecto al virus wt virulento a 2 ddi ( $FC \geq 2$  o  $FC \leq -2$ ;  $FDR < 0,05$ ). Estos genes diferencialmente expresados en presencia o ausencia de la proteína E del SARS-CoV se clasificaron funcionalmente mediante el programa *GeneCodis* (<http://genecodis.cnb.csic.es/>) en grupos funcionales con significancia estadística ( $p\text{-valor} < 0,01$ ) (Fig. 14). Los genes sobre-expresados en la infección por el SARS-CoV-ΔE respecto a la infección con SARS-CoV-wt se agruparon mayoritariamente en funciones de unión a proteínas, desarrollo, adhesión celular, transporte de iones, transducción de señales, incluyendo el calcio, y actividad canal iónico (Fig. 14A). Estos resultados indicaron que en presencia de la proteína E los genes asociados a estas

actividades celulares estaban regulados negativamente de acuerdo con lo descrito previamente en nuestro laboratorio sobre las funciones de la proteína E: (i) actividad canal iónico y transporte de iones calcio que activan el inflamasoma (Nieto-Torres y col., 2015); (ii) interacción mediada por motivos PBM-PDZ con proteínas celulares implicadas en transducción de señales, como la sintenina (Jimenez-Guardeño y col., 2014), o en la modificación de las uniones entre células (Teoh y col., 2010). Por el contrario, en ausencia de la proteína E se redujo la expresión de genes relacionados con las respuestas inflamatoria, inmune innata y la defensiva frente a virus, y las citoquinas (Fig. 14B), como se podría esperar en la infección por virus atenuados (DeDiego y col., 2007), que causan una menor inflamación pulmonar.

La identificación de dianas potenciales para los 23 miRNAs que cambiaron su expresión en la infección con el virus atenuado respecto al virulento entre estos mRNAs diferencialmente expresados utilizando el programa *RNAhybrid* es un objetivo de alto interés. Dado que el número de mRNAs en esta búsqueda es discreto ( $560+503=1063$ ) y se conoce que la interacción mRNA-miRNA es canónica, se espera encontrar un número limitado de posibles dianas para validar experimentalmente en las muestras infectadas (Manuscrito en preparación).

A

GENES REGULADOS  
POSITIVAMENTE EN AUSENCIA  
DE LA PROTEÍNA E



- Unión a proteínas
- Desarrollo multicelular del organismo
- Adhesión celular
- Unión a ión calcio
- Desarrollo multicelular del organismo y diferenciación celular
- Actividad receptor e interacción receptor-ligando neuroactivo
- Transporte, transporte de iones, actividad canal iónico
- Actividad receptor, transducción de señales e interacción receptor-ligando neuroactivo
- Vía de señalización de calcio
- Actividad receptor, vía de señalización del receptor acoplado a proteína G, transducción de señales, actividad receptor acoplado a proteína G e interacción receptor-ligando neuroactivo

B

GENES REGULADOS  
NEGATIVAMENTE EN AUSENCIA  
DE LA PROTEÍNA E



- Interacción citoquina-receptor citoquina
- Actividad citoquina
- Respuesta inflamatoria
- Respuesta inmune
- Respuesta inmune innata
- Respuesta a virus
- Actividad citoquina e interacción citoquina-receptor citoquina
- Respuesta inmune y actividad citoquina
- Respuesta de defensa a virus
- Respuesta celular a interferón beta

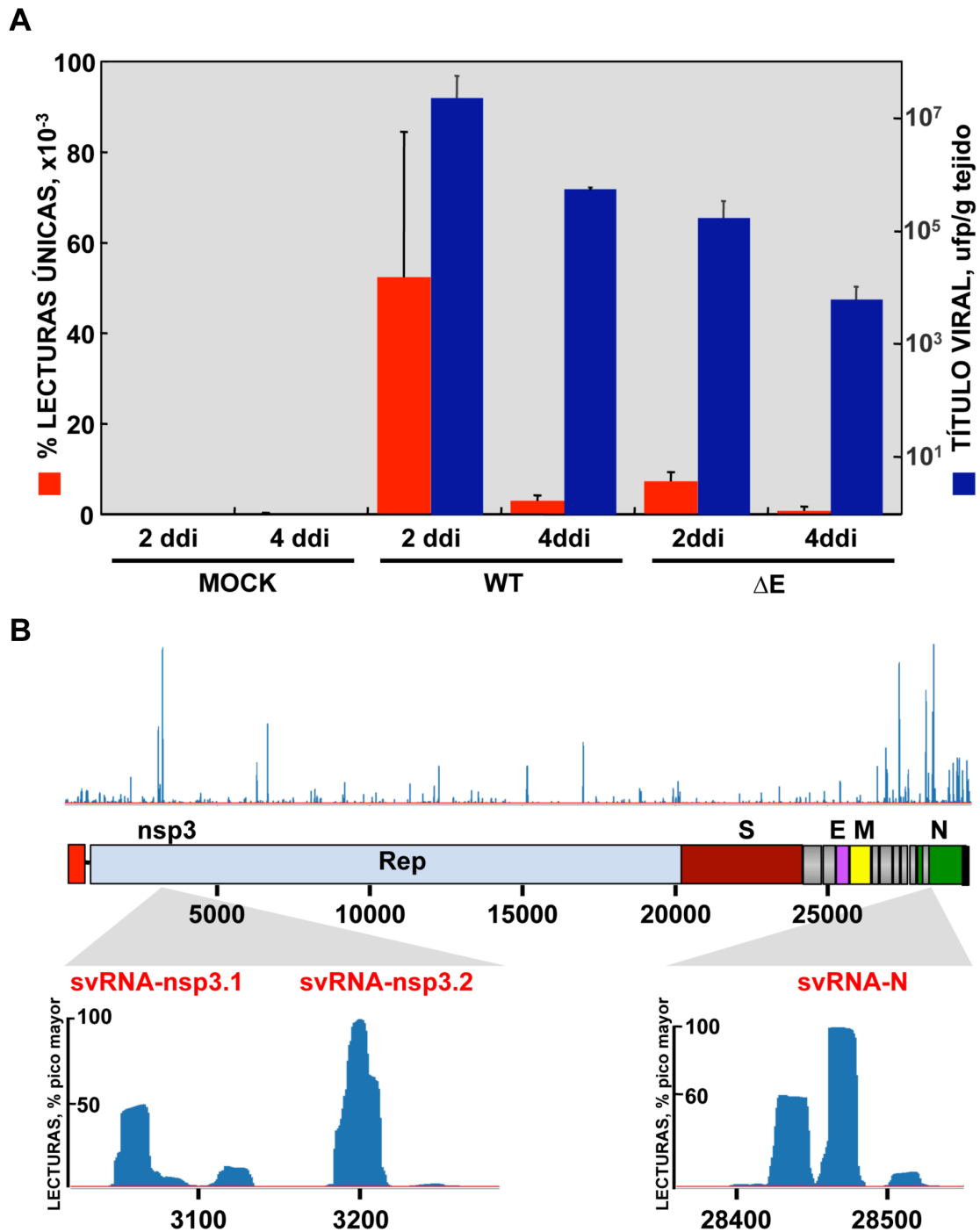
**Figura 14. Análisis funcional de los RNAs largos diferencialmente expresados en los pulmones de ratones infectados con el virus SARS-CoV-wt o con el mutante de delección sin proteína E SARS-CoV-ΔE.** Los RNAs largos identificados por secuenciación masiva en los pulmones de ratones infectados y diferencialmente expresados ( $FDR \leq 0,05$ ) en la infección con el virus atenuado (SARS-CoV-ΔE) respecto al virulento (SARS-CoV-wt) se clasificaron en rutas funcionales (*GeneCodis*) significativamente enriquecidas ( $p\text{-valor} < 0,01$ ). (A) Funciones en las que se agrupan los genes regulados positivamente en la infección con el virus atenuado sin la proteína E respecto al virulento, con la proteína E. (B) Funciones en las que se agrupan los genes regulados negativamente en la infección con el virus atenuado sin la proteína E respecto al virulento, con la proteína E.

### 3. IDENTIFICACIÓN DE RNAs PEQUEÑOS DERIVADOS DEL GENOMA DE SARS-CoV

#### 3.1. Identificación de secuencias de RNAs pequeños no codificantes derivados del genoma de SARS-CoV en pulmones de ratón

La secuenciación masiva de los pulmones de ratones infectados con SARS-CoV mostró que un porcentaje inferior al 0,1% de las secuencias de RNAs pequeños alineaba con el genoma del virus (Sección 1.3.), en contraste al porcentaje residual ( $<0,0001\%$ ) obtenido en los pulmones de ratones no infectados (Tabla VII). La abundancia relativa de estas secuencias únicas de RNAs pequeños de origen viral fue mayor en las muestras con mayor título viral (Fig. 5B). Tal fue el caso de las presentes en las infectadas con el virus wt respecto al mutante  $\Delta E$  (Fig. 15A) o las observadas a 2 ddi, respecto a los de 4 ddi. En las infecciones con el virus wt a 2 ddi se obtuvieron los títulos virales más elevados ( $>10^7$  ufp por gramo de tejido) y también el mayor número de secuencias de RNAs pequeños que alineaban con el genoma viral (hasta un 0,05% de todas las secuencias de RNAs pequeños). Por el contrario, en las infecciones con el virus atenuado  $\Delta E$  se detectaron títulos significativamente más bajos ( $10^4$ - $10^5$  ufp por gramo de tejido a 2 y 4 ddi, respectivamente) y, en consecuencia, un menor número de secuencias que alineaban con el genoma viral (alrededor de 0,001%) (Fig. 15A). Por tanto, existía una correlación directa entre la abundancia de RNAs pequeños derivados del virus y el título viral (Fig. 15A).

La visualización del alineamiento de las secuencias de RNAs pequeños con el genoma del virus, utilizando el programa *SeqMonk*, mostró que estas secuencias tenían polaridad positiva, como el genoma viral. Aunque se observaron secuencias a lo largo de todo el genoma (Tabla VII), su abundancia no era uniforme y se distinguía un enriquecimiento relativo en los extremos 5' y particularmente 3' del genoma (Fig. 15B). Esta acumulación hacia el extremo 3' podría corresponder a productos de degradación inespecífica de RNA virales, incluyendo los RNAs subgenómicos que son 3' co-terminales con el genoma y se expresan abundantemente en la infección. Sin embargo, lo más interesante fue que se detectaron algunas secuencias muy abundantes que alineaban con regiones específicas del genoma. Estas secuencias se visualizaron como picos destacados significativamente respecto al fondo, que corresponderían a RNAs pequeños derivados del genoma del SARS-CoV distintos de los productos de degradación inespecífica del genoma (Fig. 15B). Entre las diez secuencias de RNAs virales más abundantes (Tabla XI) se seleccionaron para su estudio posterior tres que sumaban en torno al 18% del total de secuencias que alineaban con el genoma del virus (Tabla XII) (Morales y col., 2017).



**Figura 15. Alineamiento de las secuencias de RNAs pequeños de pulmones de ratón con el genoma del SARS-CoV.** (A) Número de lecturas normalizadas por millón de lecturas que alinean específicamente (lecturas únicas) en el genoma del SARS-CoV. Se muestran los datos obtenidos por secuenciación masiva de los pulmones de ratones no infectados (MOCK) o infectados con el SARS-CoV-wt (WT) o el mutante de delección SARS-CoV-ΔE (ΔE) a 2 y 4 ddi. Para cada muestra se indica el título viral por gramo de tejido pulmonar. (B) Visualización con el programa *SeqMonk* de las secuencias de RNAs pequeños que alinean de forma específica con determinadas regiones del genoma viral, dando lugar a picos cuya altura es proporcional a la abundancia de lecturas. Los picos representan *small viral RNAs* (svRNAs). Debajo se muestra un esquema del genoma viral con los nombres de los genes más representativos. Los números indican posiciones en nt. En la línea de abajo se amplía la posición en el genoma de tres de los svRNAs más abundantes, svRNA-nsp3.1, svRNA-nsp3.2 y svRNA-N, cuya secuencia e información más detallada se encuentra en la Tabla XII. La altura de los picos representa la

cantidad de lecturas que alinean en el genoma y se expresa como un porcentaje relativo al pico de mayor altura.

**Tabla XI. Selección de los diez RNAs virales pequeños (svRNAs) más abundantes en los pulmones de ratones infectados con SARS-CoV.**

svRNA	Secuencia 5'→3'	Posición en genoma, nt	Número de lecturas SARS-CoV-wt 2 dpi
<b>nsp3.1</b>	GAGGAAGAAGAGGACGAT	3052-3069	594
<b>nsp3.2</b>	GAGGAAGAAGAAGAGGAAGACT	3184-3205	1202
<b>nsp3.3</b>	AGAAGACACACAAGGAATGGA	6285-6306	319
<b>nsp3.4</b>	AGGACAAGCAGCAATTACAAC	6633-6654	617
<b>nsp13</b>	CAAAAGGTCGGCATGCAAAAGTA	16974-16996	474
<b>M</b>	AAGAGATCACTGTGGCTACATC	26891-26912	432
<b>7a</b>	CAGGAGTGTGTTAGAGGTACGA	27333-27354	1088
<b>N-9b</b>	AATGGAGGACGCAATGGGGCAA	28207-28228	873
<b>NTD-N</b>	AAAGAGCTCAGCCCCAGATGGT	28426-28447	706
<b>N</b>	AGGAACTGGCCCAGAAGCTTC	28461-28481	1225

Se indican en la tabla la secuencia de RNA, localización en el genoma del SARS-CoV y número total de lecturas obtenidas por secuenciación masiva en una de las réplicas de la infección con SARS-CoV-wt 2 dpi.

Estas tres secuencias denominadas *small viral RNA* o svRNA tenían entre 18 y 22 nt de longitud y polaridad positiva. Dos de ellas, svRNA-nsp3.1 y svRNA-nsp3.2, alineaban con el extremo 5' del gen 1, la replicasa del virus, en la región que codifica la nsp3 (Fig. 15B y Tabla XII). Ambos svRNAs procedían de dos posiciones muy próximas entre sí (nucleótidos 3.052 y 3.184, respectivamente) en los dos extremos del dominio hipervariable de la proteína nsp3, rico en ácido glutámico. La tercera secuencia, svRNA-N, alineó con el gen N (nt 28.461), localizado en el extremo 3' del genoma, dentro de la región que codifica el dominio de unión a RNA. La abundancia de las tres secuencias en las muestras de pulmones infectados con el virus wt y  $\Delta E$  se correlacionó positivamente con los títulos virales (Tabla XII y Fig. 15A). En los pulmones de los ratones infectados con el virus wt a 2 ddi se cuantificaron entre 386 y 832 lecturas de cada una de las tres secuencias, mientras que a día 4 di, cuando el título viral había disminuido significativamente, el número de lecturas disminuyó a 30-80. En los pulmones de los ratones infectados con el virus  $\Delta E$  atenuado, que crecía con títulos de 1-2 unidades logarítmicas menores, la abundancia de svRNAs también fue significativamente menor que en el virus wt (121-169 lecturas a 2 ddi y 17-33 a 4 ddi).

## Resultados

Tabla XII. RNAs virales pequeños (svRNAs) identificados por secuenciación masiva en los pulmones de ratones infectados con SARS-CoV y caracterizados en esta memoria.

svRNA	Secuencia 5'→3'	Posición en genoma, nt	Número de lecturas			
			SARS-CoV-wt		SARS-CoV-ΔE	
			2 ddi	4 ddi	2 ddi	4 ddi
<b>nsp3.1</b>	GAGGAAGAAGAGGACGAT	3052-3069	386	44	121	23
<b>nsp3.2</b>	GAGGAAGAAGAAGAGGAAGACT	3184-3205	832	80	169	33
<b>N</b>	AGGAACTGGCCCAGAAGCTTC	28461-28481	706	30	136	17
<b>neg</b>	AATCAGTTTACTGGTTATTTAA	3274-3295	0	0	0	0
<b>svRNAs (%)</b>			<b>13,6</b>	<b>12,1</b>	<b>22,2</b>	<b>22,5</b>

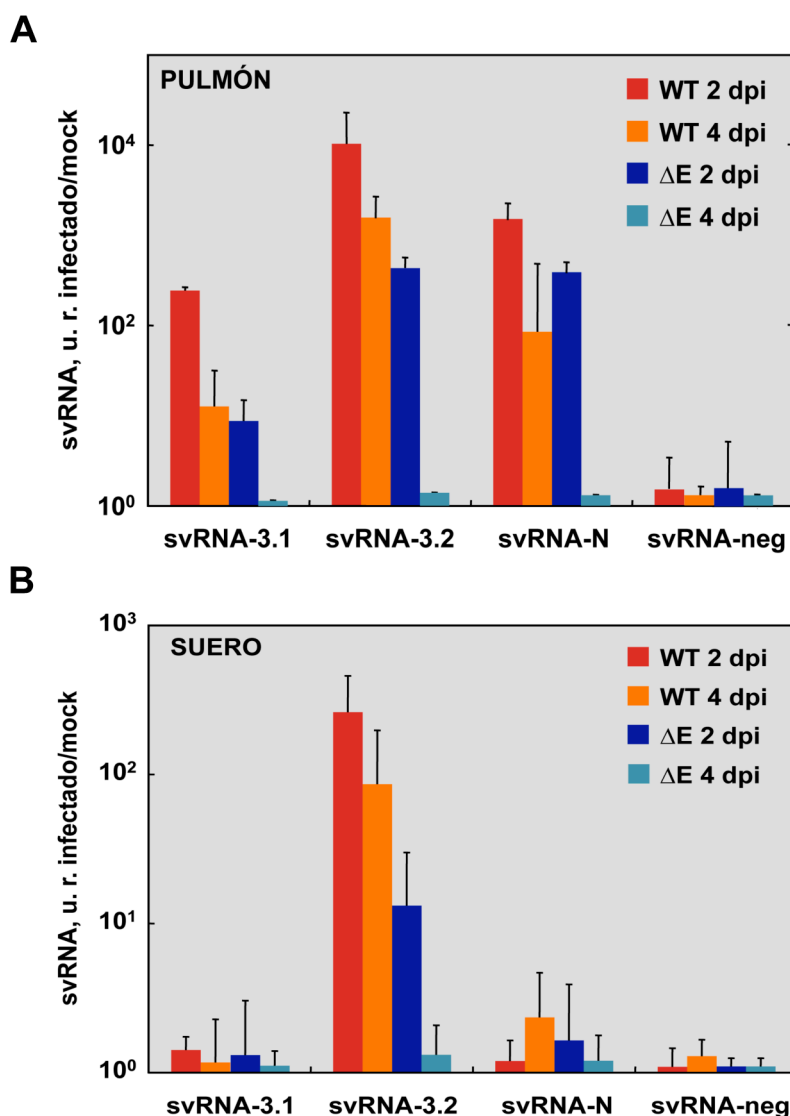
Se indican en la tabla la secuencia de RNA, localización en el genoma del SARS-CoV y número total de lecturas promedio en las réplicas. svRNA (%), porcentaje de las lecturas de los svRNAs nsp3.1, nsp3.2 y N respecto al total de lecturas que alinean con el genoma de SARS-CoV.

La presencia de estos tres RNAs pequeños derivados del virus (svRNAs-nsp3.1, -nsp3.2 y -N), en las muestras de pulmón de los ratones infectados se confirmó mediante una técnica alternativa como la RT-qPCR. Se diseñaron ensayos *TaqMan* a medida para los tres svRNAs y para una secuencia del virus muy cercana a los svRNA-nsp3.1 y -nsp3.2 en la región nsp3, que no había generado lecturas en la secuenciación masiva y que se utilizó como control negativo en posteriores experimentos (svRNA-neg) (Tabla XII). Los niveles de los tres svRNAs detectados por qPCR se incrementaron hasta  $10^4$  veces en los pulmones infectados con el virus virulento o atenuado respecto a los no infectados, a diferencia del svRNA-neg casi indetectable en todas las muestras y se correlacionaron positivamente con los títulos virales (Fig. 15A, Fig. 16A y Tabla VII). Estos resultados validaron la especificidad de la técnica de RT-qPCR para la detección de los svRNAs y permitieron aplicarla a la detección de svRNAs tanto en el pulmón como en otros tejidos del ratón y en cultivos celulares.

Se ha descrito la presencia de miRNAs en varios fluidos incluyendo suero, plasma o saliva, asociados bien a vesículas membranosas como exosomas o bien acompañados con proteínas de unión a RNA como Ago2 (Chen y col., 2012). Por ello, se analizó la presencia de los svRNAs en el suero de los ratones por qPCR. Únicamente el svRNA-nsp3.2 se detectó significativamente en el suero de los ratones infectados (Fig. 16B), con abundancias relacionadas con los títulos de ambos virus, SARS-CoV wt y ΔE, en distintos días después de la infección. La presencia específica del svRNA-nsp3.2 en el suero de los ratones infectados y no del svRNA-N, detectado con niveles similares en el pulmón, sugirió que, el svRNA-nsp3.2 se podría transportar de forma activa a la sangre desde el tejido infectado, o que este svRNA era más estable que los svRNA-nsp3.1 y svRNA-N. Una vez en la sangre, el svRNA-nsp3.2



podría realizar alguna función sistémica, si bien esta posibilidad requiere estudios adicionales.



**Figura 16. Detección mediante RT-qPCR de los svRNAs derivados de SARS-CoV en pulmones y suero de los ratones infectados.** El RNA de los pulmones (A) y el suero (B) de los ratones infectados con el SARS-CoV wt o con el mutante de delección  $\Delta E$  a 2 y 4 ddi se cuantificó mediante RT-qPCR. La cantidad de los tres svRNAs, nsp3.1, nsp3.2 y N, y del control negativo, svRNA-neg, se calculó por el método de cuantificación relativa  $\Delta\Delta C_t$  (Livak y Schmittgen, 2001) usando el snRNA-U6 y miR-cel-39 como controles endógenos para pulmón y suero, respectivamente, y el nivel de las muestras no infectadas como referencia, con valor de 1. Se representan valores medios y sus desviaciones estándar.

### 3.2. Detección de svRNAs derivados del SARS-CoV en cultivos celulares

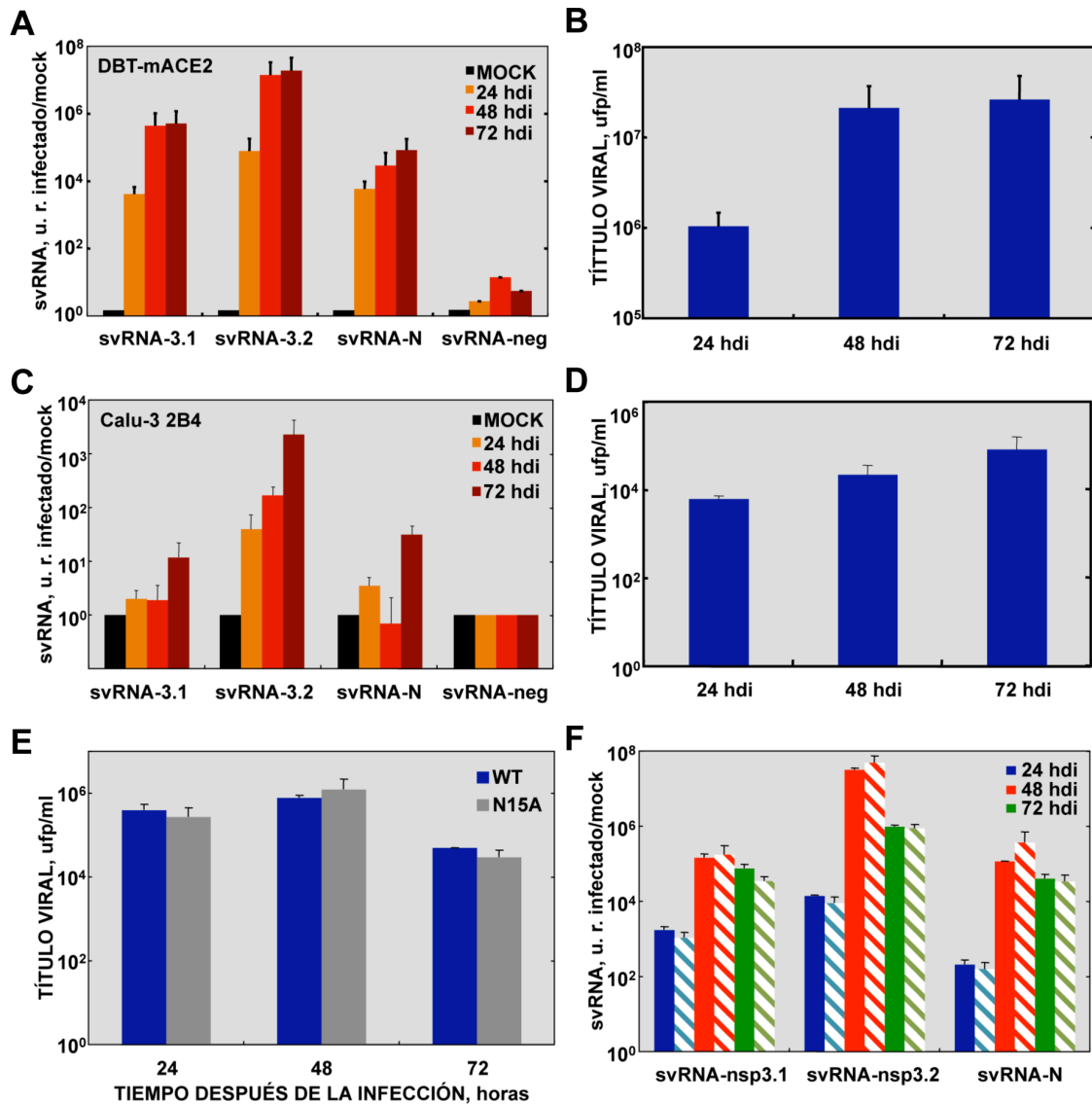
Para estudiar la relevancia funcional en la interacción virus-hospedador de los svRNAs nsp3.1, nsp3.2 y N, se exploró si estos svRNAs derivados de SARS-CoV se producían también en líneas celulares en cultivo de forma similar a lo observado en la infección *in vivo*. Aunque el sistema *in vivo* es el ideal para estudios funcionales, los

cultivos celulares permiten realizar ensayos para caracterizar ciertas funciones o la biogénesis de los svRNAs.

Se analizaron varias líneas celulares susceptibles a la infección por SARS-CoV para seleccionar aquella que reprodujera de la mejor forma posible los procesos celulares inducidos por la infección *in vivo*: (i) Células DBT-mACE2, de origen murino, que expresaban establemente el receptor ACE2 de SARS-CoV (Regla-Nava y col., 2013), dado que los svRNAs se habían detectado en ratones; y (ii) Células Calu-3 2B4, derivadas del epitelio pulmonar humano, donde se produce la infección natural del SARS-CoV. Ambas líneas celulares se infectaron a  $1 \times 10^5$  y se analizaron los niveles de svRNAs y los títulos virales a distintos tiempos después de la infección. En las células de ratón DBT-mACE2, los tres svRNAs, pero no el control negativo, aumentaron significativamente respecto a las células no infectadas ( $10^4$ - $10^7$  veces) (Fig. 17A) de acuerdo con los títulos virales obtenidos a distintos tiempos de la infección (Fig. 17B). Por el contrario, en las células de pulmón humano Calu-3 2B4 (Yoshikawa y col., 2010), tanto los niveles de svRNAs (Fig. 17C) como los títulos virales (Fig. 17D) fueron de  $10^3$ - $10^4$  veces menores que en las células DBT-mACE2. Estos resultados indicaban que la expresión de los svRNAs no era específica del tipo celular ni de la especie infectada. Además, confirmaban que la generación de los svRNAs en las células en cultivo se correlacionaba con la producción viral de forma similar a lo observado en ratón (Morales y col., 2017).

Para confirmar la observación de que los niveles de svRNAs dependen del título viral y no de otros aspectos como el fenotipo atenuado, se analizó la producción de los svRNAs en células DBT-mACE2 infectadas con el virus SARS-CoV silvestre o el mutante SARS-CoV-E-N15A, que está atenuado pero mantiene títulos virales similares al wt (Fig. 17E). Los niveles de los tres svRNAs fueron semejantes en las infecciones con ambos virus en todos los tiempos post-infección de acuerdo con sus títulos virales, confirmando que la producción de svRNAs depende de la replicación viral (Fig. 17F).

Las células DBT-mACE2, susceptibles a la infección de SARS-CoV y productoras de altos niveles de svRNAs se seleccionaron para los trabajos posteriores.



**Figura 17. Detección por RT-qPCR de svRNAs derivados de SARS-CoV en células infectadas.** El RNA y el sobrenadante de células DBT-mACE2 (A y B) y Calu-3 2B4 (C y D) infectadas con el SARS-CoV wt a mdi 1 se recogió a 24, 48 y 72 hdi para analizar los niveles de svRNAs por RT-qPCR (A y C) y los títulos virales (B y D), respectivamente. Los svRNAs se cuantificaron por el método  $\Delta\Delta C_t$  como se describe en la Figura 16. Análisis del título viral (E) y de los niveles de svRNAs (F) en células DBT-mACE2 infectadas con el virus SARS-CoV-wt o el mutante SARS-CoV-E-N15A. En el gráfico F, las barras sólidas representan al virus wt y las rayadas, el mutante N15A. Se representan valores medios y sus desviaciones estándar.

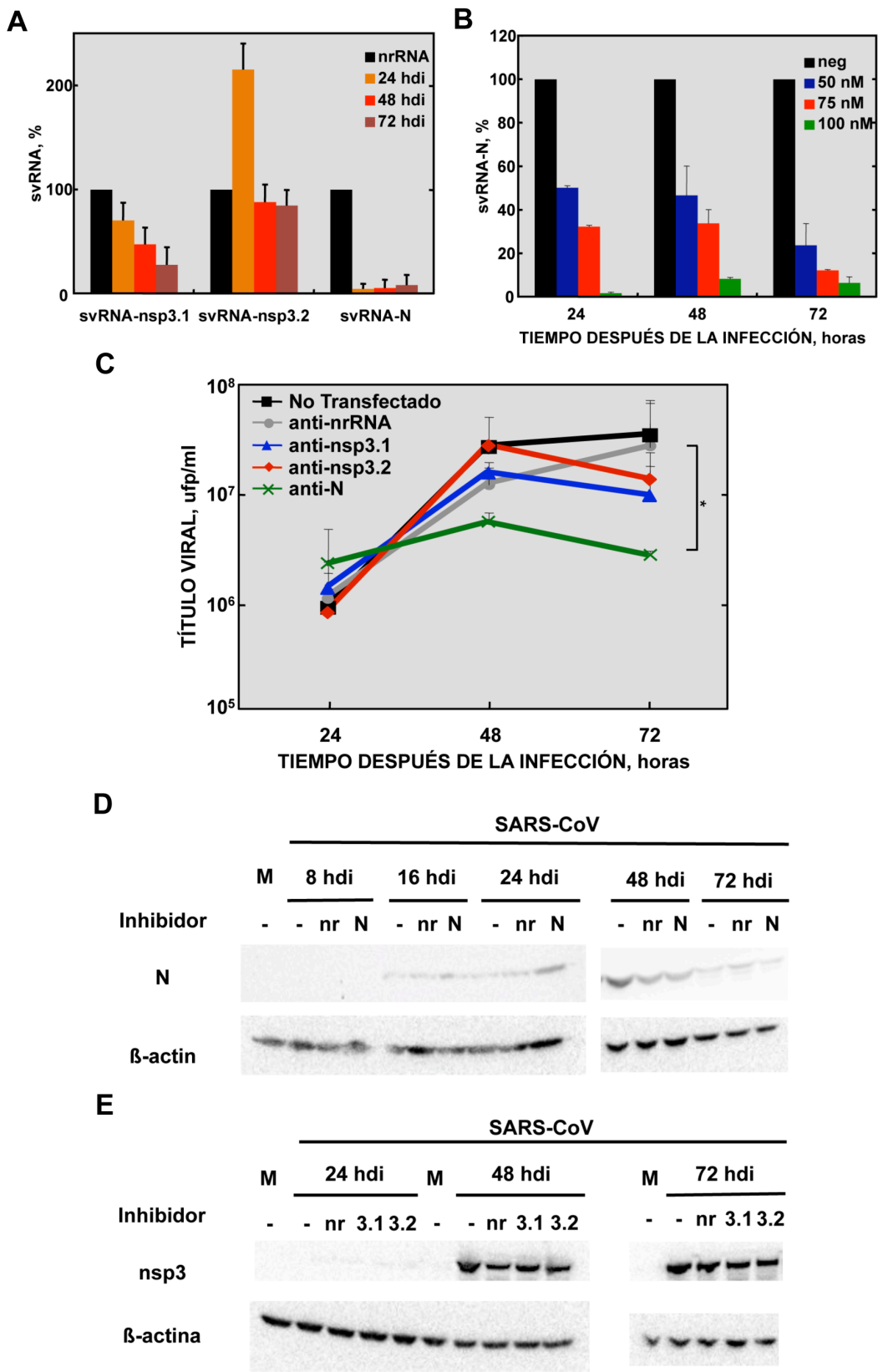
### 3.3. Inhibición de los svRNAs en células infectadas con el SARS-CoV con oligos específicos antisentido

Para estudiar la relevancia funcional de los svRNAs durante la infección del SARS-CoV, se diseñaron RNAs con secuencia complementaria a los svRNAs, de forma que hibridaran con ellos e inhibieran su función. Las células DBT-mACE2 se transfectaron independientemente con los inhibidores de cada uno de los svRNAs, nsp3.1, nsp3.2, N o un control negativo no relacionado (nrRNA) a la concentración de 75 nM 24 h antes de la infección con SARS-CoV wt (mdi 1). Los niveles de los svRNAs a 24, 48 y

72 hdi se analizaron por RT-qPCR y se compararon con los obtenidos al transfectar el control negativo, al que se dio el valor relativo de 100% (Fig. 18A). El svRNA-N se inhibió eficientemente y reduciéndose hasta un 5% del nivel en presencia del control negativo en cualquiera de los tres tiempos analizados. Además, el estudio de la relación dosis-respuesta mostró que la disminución de los niveles del svRNA-N fue directamente proporcional a la cantidad de inhibidor anti-svRNA-N transfectado (Fig. 18B), indicando que el efecto era específico. La inhibición del svRNA-nsp3.1 fue más discreta y aumentó con el transcurso de la infección reduciendo los niveles del svRNA hasta un 27% del nivel en presencia del control negativo (Fig. 18A). Sin embargo, los niveles del svRNA-nsp3.2 no se redujeron en presencia del inhibidor a ninguna de las dosis analizadas, 25 nM (no mostrado) y 75 nM (Fig. 18A). Es posible que esta ausencia de inhibición aparente se deba a la interferencia de los oligonucleótidos del ensayo de qPCR con el oligonucleótido antisentido utilizado como inhibidor, dado que comparten parte de la secuencia, por lo que se estarían produciendo artefactos en la detección, como se ha descrito (Torres y col., 2011). Alternativamente, el inhibidor podría estar interaccionando con el svRNA y reprimiendo su función sin inducir la degradación del svRNA (Davis y col., 2009), por lo que seguiría presente. Se estudió si los inhibidores específicos de los svRNAs producían un efecto biológico sobre el propio virus. Para ello se determinaron los títulos virales en el sobrenadante de las células transfectadas con los inhibidores y posteriormente infectadas con el SARS-CoV (mdi 1). Los títulos virales en las células transfectadas con los inhibidores de svRNA-nsp3.1 o svRNA-nsp3.2 se redujeron moderadamente a las 72 hdi respecto a las células transfectadas con el inhibidor control negativo (Fig. 18C), sugiriendo un leve efecto en el crecimiento del virus a tiempos largos después de la infección. La inhibición del svRNA-N redujo más significativamente (10 veces) el título viral a las 48 y 72 hdi. Estos resultados indicaron que la reducción de los niveles de svRNAs, especialmente el svRNA-N, afectaron de forma negativa, pero moderada al título viral y, por tanto, que los svRNAs derivados del genoma viral podrían contribuir de alguna forma al crecimiento del virus (Morales y col., 2017).

Se estudió el efecto de la inhibición de los svRNAs en la expresión de las proteínas virales nsp3 y N en las células infectadas mediante *western blot*. La proteína N se detectó a partir de las 16 hdi. Sus niveles aumentaron hasta alcanzar el máximo a las 48 hdi y disminuyeron a las 72 hdi como consecuencia de la degradación por caspasas (Fig. 18D) (Eleouet y col., 2000). No se observaron diferencias en la cantidad de proteína N en presencia del inhibidor anti-svRNA-N respecto al control negativo (nr) a ninguno de los tiempos analizados. La proteína nsp3 se detectó a partir de las 24 hdi, aunque sus niveles máximos se alcanzaron a las 48 hdi y se

mantuvieron hasta las 72 hdi. Tampoco se observaron cambios significativos en la abundancia de nsp3 en presencia de los inhibidores anti-svRNA-nsp3.1 o anti-svRNA-nsp3.2 (Fig. 18E).



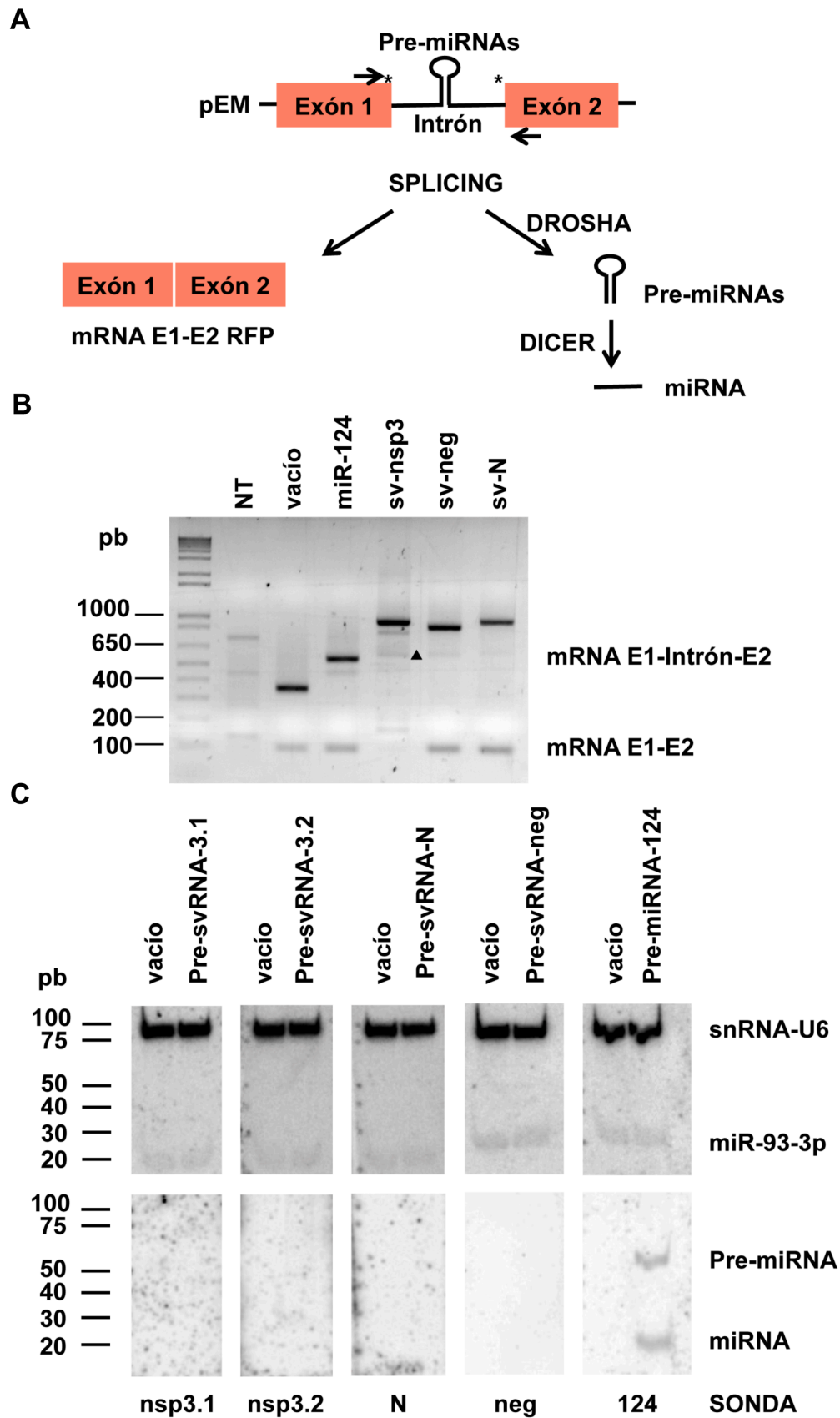
**Figura 18. Efecto de la inhibición de los svRNAs derivados de SARS-CoV en el crecimiento del virus en células DBT-mACE2 infectadas.** Se transfectaron células DBT-mACE2 con inhibidores de svRNAs, nsp3.1, nsp3.2 y N, o con un RNA no relacionado como control negativo (nrRNA). Después de 24 h, las células se infectaron con SARS-CoV wt a una mdi de 1 y se recogió el RNA, sobrenadante y proteína, a las 24, 48 y 72 hdi para analizar los niveles de svRNAs (A y B), los títulos virales (C) y la cantidad de proteína N (D) y nsp3 (E), respectivamente. (A) Niveles de cada uno de los svRNAs después de la inhibición con 75 nM de cada inhibidor específico. La cuantificación se realizó por el método  $\Delta\Delta C_t$  como se indica en la Figura 16. (B) Efecto de la dosis de inhibidor en la inhibición del svRNA-N. (C) Título viral en las células transfectadas con los inhibidores de cada svRNA a la concentración 75 nM y a distintos tiempos después de la infección. Análisis por *western blot* de extractos de células DBT-mACE2 transfectadas con los inhibidores de los svRNAs (N, nsp3.1 y nsp3.2) e infectadas con SARS-CoV. Se detectó la proteína N (D) y nsp3 (E). La  $\beta$ -actina se usó como control de carga. nr, células transfectadas con el inhibidor control negativo; M, células no infectadas. Se representan valores medios y sus desviaciones estándar. \*, p-valor<0,05.

Aunque la inhibición de los svRNAs, principalmente del svRNA-N, en cultivos celulares afectó moderadamente al crecimiento del virus en las células infectadas a tiempos tardíos, no se observó un efecto significativo sobre la replicación, transcripción (datos no mostrados) o niveles de proteínas virales. Para investigar la acción de los svRNAs sobre el virus y sobre el hospedador en un sistema fisiológicamente relevante, sería necesario realizar los ensayos de pérdida de función de los svRNAs en el modelo de infección *in vivo*.

#### **4. ESTUDIO DE LA BIOGÉNESIS DE LOS svRNAs DERIVADOS DE SARS-CoV**

##### **4.1. Procesamiento de los svRNAs por la maquinaria celular**

Un aspecto relevante de los svRNAs es su biogénesis, es decir, cómo se generan a partir del genoma del SARS-CoV. Por su tamaño, los svRNAs recuerdan a los miRNAs celulares, cuya biogénesis depende de varios enzimas de procesamiento de RNA como Drosha y Dicer (Fig. 3A). Por otra parte, para la generación de RNAs pequeños derivados de virus se han descrito mecanismos alternativos que incluyen tanto enzimas que forman parte del procesamiento canónico de miRNAs celulares, como exonucleasas celulares o proteínas virales (Shapiro y col., 2010; Shi y col., 2014; Roby y col., 2014; Perez y col., 2010).



**Figura 19. Análisis del procesamiento de los svRNAs por la maquinaria celular de *splicing* de mRNAs.** Se transfectaron células MDCK con los precursores de los tres svRNAs, el control negativo que no se procesa y el control positivo miR-124 que se procesa por la maquinaria celular. (A) Esquema del plásmido pEM que codifica los exones 1 y 2 de la proteína roja fluorescente (RFP) separados por un

intrón en el que se introducen los precursores de miRNAs (pre-miRNA-124), utilizado como control positivo, o de los svRNAs. El procesamiento del RNA (*splicing*) entre las secuencias de *splicing* (\*) situadas en el extremo 3' del exón 1 y 5' del exón 2 genera la fusión de ambos exones en la proteína RFP, que se detecta como fluorescencia roja. El procesamiento libera el lazo con el precursor de miRNAs, que es procesado en el núcleo por Drosha y posteriormente en el citoplasma por Dicer generando el miRNA maduro. Las flechas en el esquema de pEM indican los oligos utilizados en el análisis por RT-PCR mostrados en B. (B) Detección por RT-PCR del RNA no procesado (E1-intrón-E2) y procesado por la maquinaria de *splicing* (mRNA E1-E2) de 97 nt. El triángulo representa el producto de procesamiento del precursor nsp3 por *splicing* alternativo dando lugar a un mRNA de 595 nt. (C) Detección por *northern blot* de los RNAs procesados a partir de los precursores utilizando sondas específicas marcadas radioactivamente (Tabla III). La sonda detecta el miRNA maduro de 22 nt y su precursor de 60 nt (Pre-miRNA). En todos los casos se usó como control de carga el snRNA-U6 y como control endógeno el miR-93-3p.

Para estudiar si los svRNAs de SARS-CoV se procesaban por la maquinaria celular responsable de generar miRNAs, se transfectaron células MDCK con plásmidos pEM-dsRED con secuencias virales de unos 600 nt de longitud que contenían cada svRNA y podrían actuar como precursores en el procesamiento como ya se había descrito para el miRNA-124 (Varble y col., 2010). La extensión de estas secuencias fue amplia, porque se desconocía cuál sería el entorno mínimo del svRNA necesario para su procesamiento. Las secuencias precursoras se incluyeron en un intrón que separaba los dos exones del gen marcador de la proteína roja fluorescente (RFP) (Fig. 19A). El procesamiento del RNA (*splicing*) daba lugar, por una parte, a la fusión de los exones para formar el mRNA de RFP (Fig. 19A), que se expresaba como fluorescencia roja en las células transfectadas. Por otra parte, a partir del intrón liberado, las posibles secuencias precursoras serían procesadas por la maquinaria de los miRNAs celulares hasta generar el svRNA maduro. En el plásmido que contenía secuencias del gen nsp3, que podrían ser precursoras de los svRNA-nsp3.1 y svRNA-nsp3.2, no se detectó la fluorescencia roja de RFP, lo que indicaba que el procesamiento del RNA no era el esperado (Fig. 19B y Tabla XIII). Utilizando un programa de predicción de sitios de *splicing* (*NetGene2*), se identificó en la secuencia precursora de nsp3 una secuencia aceptora de *splicing* alternativa que daría lugar a un mRNA con distinta fase de lectura que ya no codificaba la proteína RFP. Para confirmar esta posibilidad, el RNA de las células transfectadas con los plásmidos precursores se analizó por RT-PCR usando oligonucleótidos que hibridaban en los extremos 5' y 3' de los exones E1 y E2 de RFP, respectivamente. Se comprobó que en todas las construcciones analizadas, excepto en la que incluía secuencias precursoras de svRNAs nsp3.1 y nsp3.2 (sv-nsp3), el procesamiento del RNA daba lugar al mRNA de 97 nt resultado de la fusión de los exones E1-E2, como se esperaba (Fig. 19B y Tabla XIII). Por el contrario, en el plásmido con las secuencias de los svRNAs nsp3.1 y nsp3.2 no se detectó el producto de procesamiento de 97 nt, sino otro de mayor tamaño (595 nt) que correspondía al procesamiento alternativo previsto.



Por tanto, este plásmido no liberaba el lazo que actuaría como precursor de los svRNAs y no era válido para estudiar el procesamiento de las secuencias virales hasta el svRNA maduro. Para evitar el *splicing* alternativo, se propuso construir dos plásmidos independientes con secuencias precursoras de svRNA-nsp3.1 y nsp3.2. El precursor del svRNA-nsp3.2 contenía el sitio aceptor correcto. Sin embargo, no fue posible eliminar el sitio aceptor alternativo en el precursor de svRNA-nsp3.1, por localizarse solo 2 nt por delante de la secuencia del svRNA-nsp3.1. Por lo tanto, solo se observó la fluorescencia roja en las células MDCK transfectadas con el plásmido que contenía svRNA-nsp3.2, confirmando que el RNA se había procesado correctamente liberando el lazo que incluía svRNA-nsp3.2.

Para analizar si la maquinaria celular procesaba los lazos precursores y producía svRNAs maduros, se realizó un *northern blot* con sondas específicas para cada svRNA o para el control positivo miR-124 (Fig. 19C). Se confirmó la liberación por Drosha del lazo de RNA de 60 nt precursor del miR-124 y su procesamiento eficiente por Dicer para generar el miR-124-3p maduro de 22 nt. Sin embargo, en ninguna de las construcciones con secuencias precursoras de svRNAs se detectó la forma procesada de 18-22 nt, indicando que la maquinaria celular de síntesis de miRNAs no procesaba las secuencias virales de 200 nt que contenían los svRNAs nsp3.1 y nsp3.2, ni las de 600 nt que incluían el svRNA-N. Estos resultados implicaban, bien que la maquinaria celular necesitaba entornos de secuencia diferentes para su reconocimiento y función, o más probablemente, que el procesamiento de los svRNAs a partir del genoma viral requería proteínas virales o factores celulares inducidos durante la infección. Estudiar la biogénesis de los svRNAs a partir de plásmidos precursores durante la infección resultaría inviable porque los svRNAs naturales derivados del genoma viral serían indistinguibles de los procedentes del procesamiento de plásmidos.

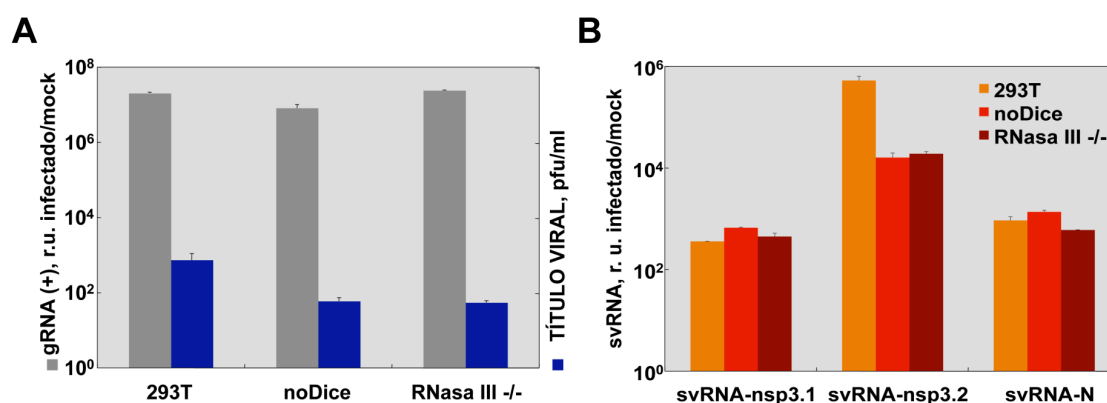
Tabla XIII. Análisis por RT-PCR del procesamiento de secuencias precursoras de la expresión de los svRNAs clonadas en el plásmido pEM entre los exones 1 y 2 de dsRed.

pEM-precursor no procesado	RNA	Procesamiento canónico RNA (exón1-exón2)	Procesamiento alternativo
NT	-----	-----	-----
Vacío	343 pb	97 pb	-----
mir-124	559 pb	97 pb	-----
svRNA-nsp3	960 pb	97 pb	595 pb
svRNA-neg	891 pb	97 pb	-----
svRNA-N	971 pb	97 pb	700 pb

Se indica el tamaño en pares de bases (pb) de los productos de procesamiento esperados (Fig. 19).

#### 4.2. Relevancia de las enzimas celulares de procesamiento de miRNAs, Drosha y Dicer, en la biogénesis de svRNAs

Para estudiar la contribución específica de las enzimas celulares de procesamiento de miRNAs, Drosha y Dicer, en la biogénesis de los svRNAs en el contexto de la infección, se utilizaron células 293T deficientes en Dicer (noDice) o en ambas enzimas Drosha y Dicer (RNasa III  $-/-$ ). Estas células noDice y RNasa III  $-/-$ , obtenidas mediante edición del genoma con CRISPR-Cas9 (Dai y col., 2016), no eran susceptibles a la infección por SARS-CoV. Para hacerlas susceptibles, fue necesario transfectarlas con un plásmido que expresaba transitoriamente la proteína mACE2 (Regla-Nava y col., 2013), el receptor murino del SARS-CoV. Para confirmar su susceptibilidad a SARS-CoV, se analizaron los niveles de gRNA y los títulos virales en las células transfectadas e infectadas (Fig. 20A). Aunque los niveles de gRNA indicaron que el virus se replicaba eficientemente, los títulos obtenidos fueron modestos, posiblemente en parte, porque la expresión del receptor podría ser limitante. La ausencia de Dicer disminuyó ligeramente el título viral en las células noDice y RNasa III  $-/-$ , sugiriendo que Dicer podría tener algún papel durante la infección. La infección por SARS-CoV generó en las líneas celulares deficientes en Dicer y Drosha niveles significativos de los svRNAs nsp3.1, nsp3.2 y N, similares a los observados en las células 293T-mACE2 nativas (Fig. 20B), indicando que la biogénesis de los svRNAs no requería de la maquinaria canónica de producción de miRNAs, sino de factores virales o rutas celulares alternativas inducidas en la infección (Morales y col., 2017).



**Figura 20. Contribución de las enzimas de la vía canónica de procesamiento de miRNAs celulares en la biogénesis de los svRNAs derivados de SARS-CoV durante la infección.** Células 293T y deficientes en las enzimas de procesamiento de miRNAs Dicer (noDice) o ambas, Dicer y Drosha (RNasa III  $-/-$ ), se transfectaron con el receptor murino para el SARS-CoV mACE2y se infectaron a mdí 5 para determinar el título viral y los niveles de gRNA (A) y los niveles de svRNAs (B) a 24 hdi. (A) Determinación del gRNA viral por RT-qPCR con el método  $\Delta\Delta Ct$  usando el rRNA 18s como control endógeno. Los títulos virales se obtuvieron por el método de placas de lisis con los sobrenadantes de las células infectadas. (B) Expresión de los svRNAs derivados de SARS-CoV determinada por RT-qPCR con el método  $\Delta\Delta Ct$  usando el snRNA-U6 como control endógeno. Se representan valores medios y sus desviaciones estándar.

## 5. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE LOS svRNAs DERIVADOS DE SARS-CoV EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE mRNAs CELULARES

### 5.1. Silenciamiento de la expresión de proteínas marcadoras por los svRNAs

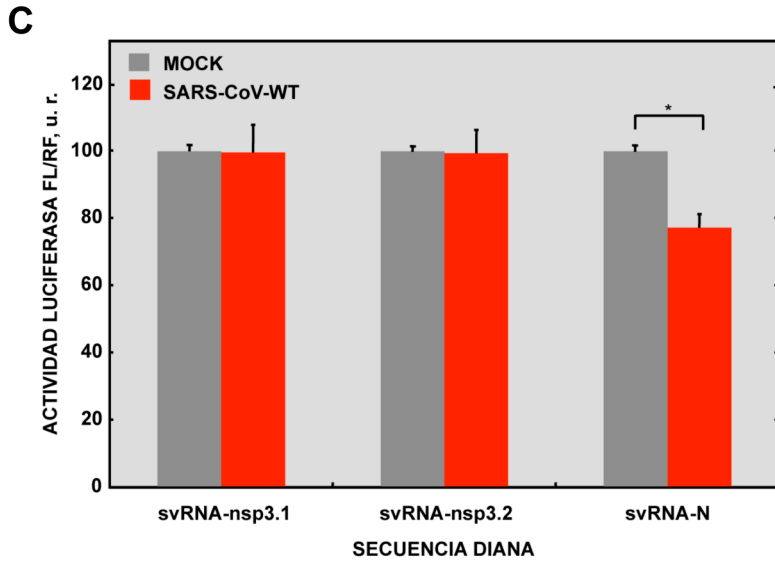
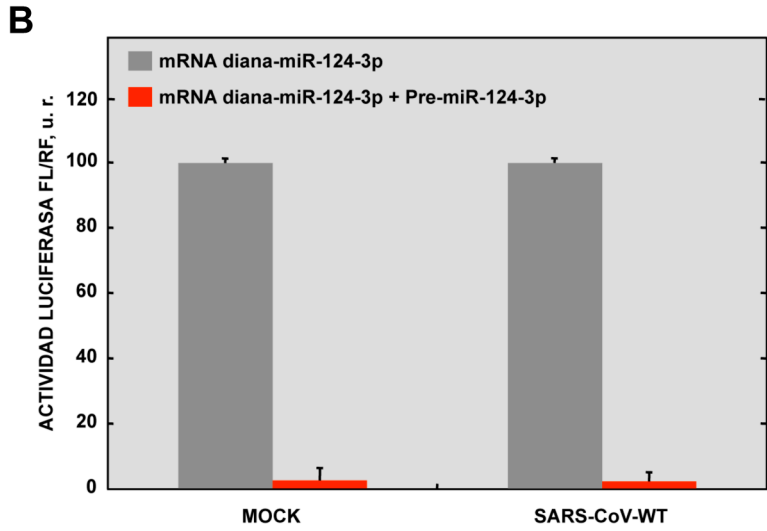
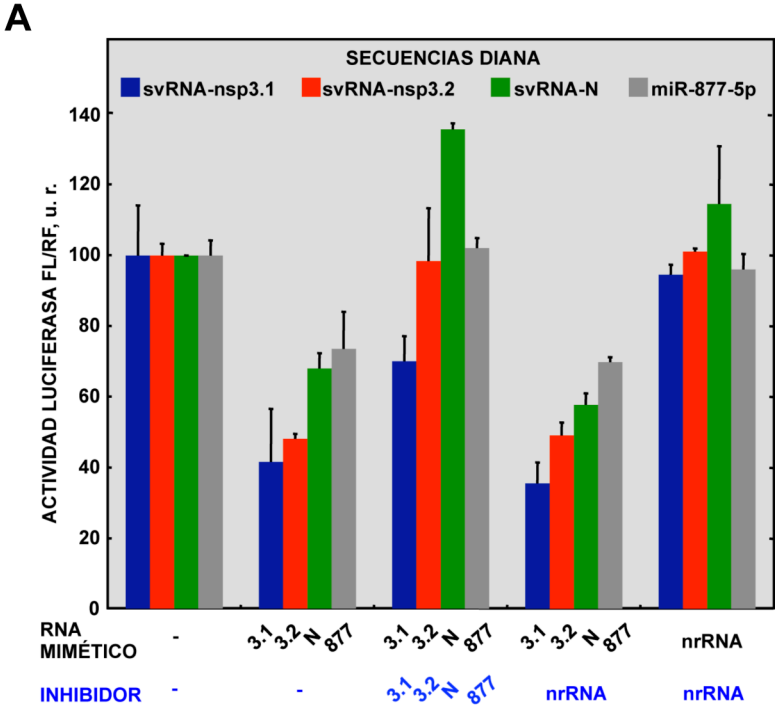
Para explorar la función de los svRNAs en la interacción virus-hospedador, se investigó la posibilidad de que actuaran de forma similar a los miRNAs celulares, como reguladores postranscripcionales de la expresión de proteínas celulares, reprimiendo la traducción de sus mRNAs.

Para estudiar la capacidad de silenciamiento de los svRNAs, se utilizó el gen marcador de la luciferasa (*Firefly*, FL), en cuyo 3' UTR se incluyeron 10 repeticiones de secuencias diana, complementarias a cada uno de los svRNAs o bien al control positivo miR-877-5p, separadas entre sí por 8 nt. Para analizar si pequeñas moléculas de RNA con la secuencia de los svRNA podían disminuir la expresión de luciferasa por un mecanismo de silenciamiento similar a los miRNAs, se transfectaron células DBT-mACE2 susceptibles a la infección por SARS-CoV con los plásmidos que contenían el gen marcador solos o junto a moléculas de RNA que mimetizaban los svRNAs (RNAs miméticos). A 24 h post-transfección, se midió la actividad luciferasa en los lisados celulares. Se confirmó que en presencia de los RNAs miméticos de cada svRNA o del control positivo miR-877-5p, la expresión de luciferasa disminuyó entre un 30 y un 60% respecto a la actividad medida en ausencia del RNA mimético o en presencia del nrRNA control negativo (Fig. 21A). El efecto de los svRNAs miméticos sobre el mRNA diana luciferasa fue específico, ya que la co-transfección con inhibidores antisentido de los svRNAs o del miR-877-5p recuperó por completo o parcialmente (en el caso del svRNA-nsp3.1, la recuperación fue hasta el 80%) la actividad luciferasa. Por el contrario, la co-transfección con un RNA no relacionado como inhibidor control negativo no varió el efecto represor de los svRNAs miméticos sobre la expresión del mRNA diana luciferasa.

Una vez confirmado que los svRNAs miméticos transfectados podían silenciar la expresión de un mRNA marcador, se estudió si la maquinaria celular de interferencia con RNA (RNAi) responsable de la represión era funcional durante la infección con SARS-CoV, dado que algunos virus inhiben este proceso (Sullivan y Ganem, 2005). Para ello, se transfectaron células DBT-mACE2 infectadas con SARS-CoV o sin infectar con un plásmido que expresaba el precursor del miR-124 (Fig. 19C) junto con otro plásmido que expresaba el mRNA de luciferasa con la secuencia diana del miR-124-3p en su 3' UTR. Si la maquinaria celular de silenciamiento por RNA estaba activa, el miR-124-3p maduro procesado a partir de su precursor se incorporaría en el complejo de silenciamiento (RISC) para reprimir la expresión de su mRNA diana. Tanto en las células no infectadas como infectadas con SARS-CoV, la transfección del

precursor de miR-124 disminuyó la actividad luciferasa en más del 95%, demostrando que en la infección del SARS-CoV la maquinaria de interferencia celular RNAi era completamente activa (Fig.21B). Por tanto, los svRNAs podrían tener un efecto en la regulación de la expresión de mRNAs celulares en la infección.

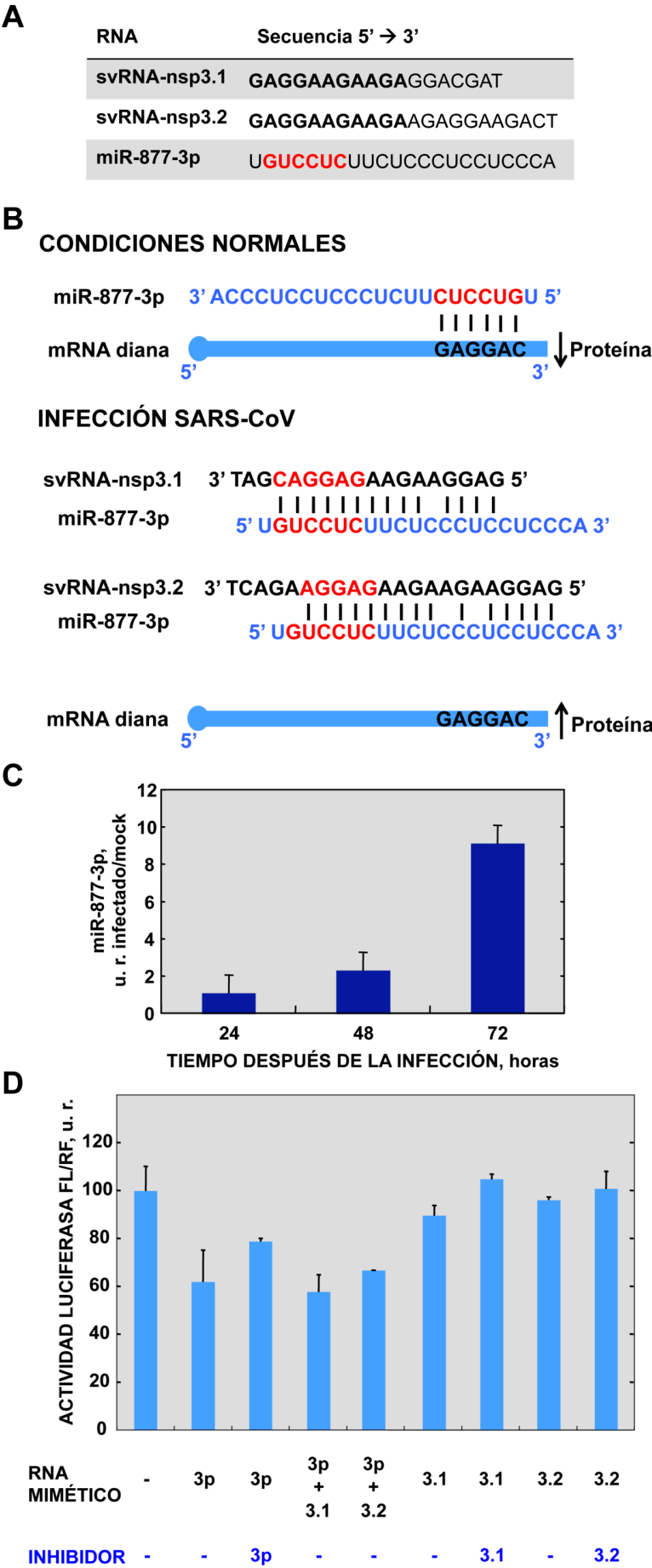
Se analizó si los svRNAs generados durante la infección de SARS-CoV podían silenciar la expresión del mRNA diana luciferasa. Para comprobarlo, se transfectaron células DBT-mACE2 con plásmidos que expresaban mRNAs de luciferasa con dianas de cada uno de los svRNAs y 6 h después se infectaron con el SARS-CoV (mdi 1). Únicamente se redujo la actividad luciferasa en un 25% durante la infección cuando el mRNA contenía las secuencias diana del svRNA-N (Fig. 21C) (Morales y col., 2017). La expresión de luciferasa no se redujo cuando el mRNA incluía las secuencias diana de los svRNAs nsp3.1 y nsp3.2, a pesar de que en ausencia de infección los svRNAs miméticos nsp3.1 y nsp3.2 sí habían mostrado una capacidad significativa de silenciamiento, incluso mayor que la del svRNA-N (Fig. 21A). Estos resultados sugerían que durante la infección, los svRNAs nsp3.1 y nsp3.2 se encontrarían en su localización natural, unidos a proteínas u otros RNAs que impedirían su acceso al mRNA diana transfectado. Dado que el svRNA-N fue el único que reprimió la expresión de su mRNA diana durante la infección y que en ensayos de pérdida de función inhibió más significativamente el crecimiento viral (Fig. 18C), este fue el svRNA seleccionado para posteriores estudios funcionales *in vivo*.



**Figura 21. Capacidad de reprimir la expresión de un mRNA marcador por los svRNAs.** (A) Células DBT-mACE2 se transfectaron con plásmidos que codifican el gen marcador luciferasa con secuencias diana de cada svRNA en el 3' UTR. Pasadas 6 h se co-transfectaron con RNAs miméticos e inhibidores de los svRNAs, del control positivo miR-877-5p o con un RNA no relacionado (nrRNA) como control negativo. Después de 18 h se cuantificó la actividad luciferasa en los lisados de las células y los niveles se relativizaron respecto al 100% de las células no transfectadas con RNAs miméticos ni inhibidores. (B) Análisis del silenciamiento de la expresión de luciferasa en células DBT-mACE2 transfectadas con el plásmido de luciferasa con las secuencias diana para el miRNA-124-3p solo o junto al plásmido del precursor del miR-124. Pasadas 6 h las células se infectaron con el SARS-CoV a mdi 1. La actividad luciferasa se cuantificó en los lisados de las células a las 18 hpi y se relativizó respecto al 100% de las células transfectadas con el plásmido de luciferasa. (C) Análisis del silenciamiento de la expresión de luciferasa en células DBT-mACE2 transfectadas con el plásmido de luciferasa con las secuencias diana de cada svRNA. Pasadas 6 h se infectaron con SARS-CoV a mdi 1 para generar los svRNAs durante la infección. La actividad luciferasa se cuantificó en los lisados de las células a 18 hpi y se relativizó respecto al 100% de las células transfectadas con el plásmido de luciferasa y no infectadas. Se representan valores medios y sus desviaciones estándar. \*, p-valor<0,05.

### 5.2. Efecto esponja de los svRNAs sobre miRNAs celulares

Además del silenciamiento de mRNAs diana, recientemente se ha descrito que los miRNAs pueden regular la expresión génica al unirse a otras moléculas como proteínas y otros RNAs no codificantes, incluyendo lncRNAs y otros miRNAs (Yoon y col., 2014; Zealy y col., 2017). La interacción con ncRNAs implica inhibir competitivamente la unión a sus respectivas dianas, evitando su función reguladora de la expresión. Por este motivo, se investigó si alguno de los svRNAs, en especial nsp3.1 y nsp3.2 que comparten 11 nt de su secuencia (Tabla XII), y que no reprimían a su mRNA diana durante la infección (Fig. 21C), eran complementarios a algún miRNA celular. La búsqueda en la base de datos de miRNAs, *miRBase*, identificó un miRNA de ratón, mmu-miR-877-3p, cuya secuencia era complementaria a 14 de los 18 nt de svRNA-nsp3.1 y a 15 de los 22 nt de svRNA-nsp3.2, incluyendo los nucleótidos de la secuencia semilla del miRNA (Fig. 22A y 22B). Por tanto, la unión de svRNA-nsp3.1 y nsp3.2 al miR-877-3p limitaría el acceso a su mRNA diana, impidiendo su efecto represor de la expresión del mRNA. Además, en células DBT-mACE2 infectadas con SARS-CoV, se detectó un aumento significativo de los niveles de miR-877-3p a lo largo de la infección (Fig. 22C).



**Figura 22. Análisis del efecto esponja de los svRNAs derivados de SARS-CoV sobre miRNAs celulares.** (A) Secuencia de los svRNA-nsp3.1, svRNA-nsp3.2 y miR-877-3p. En negrita se indican los nucleótidos que comparten los svRNAs nsp3.1 y nsp3.2. En rojo se muestra la secuencia semilla del miR-877-3p celular. (B) Predicción de interacciones entre el miR-877-3p, su mRNA diana y los svRNAs nsp3.1 y nsp3.2. En condiciones normales, la interacción del miR-877-3p con su mRNA diana mediante su secuencia semilla (rojo) promovería el silenciamiento postranscripcional y la reducción de los niveles de la proteína. En la infección del SARS-CoV, los svRNA-nsp3.1 y svRNA-nsp3.2 que tienen 14 y 15 nt complementarios con el miR-877-3p de ratón, respectivamente, incluyendo su secuencia semilla, podrían secuestrar al miRNA celular y des-reprimir a su mRNA diana, aumentando la cantidad de proteína. (C) Cuantificación del nivel del miRNA-877-3p en células DBT-mACE2 infectadas por SARS-CoV a md1 por el método  $\Delta\Delta Ct$ , usando el snRNA-U6 como control endógeno y células no infectadas como referencia con valor de 1. (D) Determinación del silenciamiento de la expresión de luciferasa por el miRNA-877-3p en presencia o ausencia de los svRNAs nsp3.1 y nsp3.2. Células DBT-mACE2 se transfectaron con plásmidos con el gen luciferasa y las secuencias diana de miR-877-3p en el 3' UTR. Pasadas 6 h se transfectaron con RNAs miméticos e inhibidores de miR-877-3p, svRNA-nsp3.1 o svRNA-nsp3.2. La actividad luciferasa se cuantificó en los lisados de las células después de 18 h y se relativizó respecto al 100% de las células transfectadas únicamente con el plásmido de luciferasa. Se representan valores medios y sus desviaciones estándar.

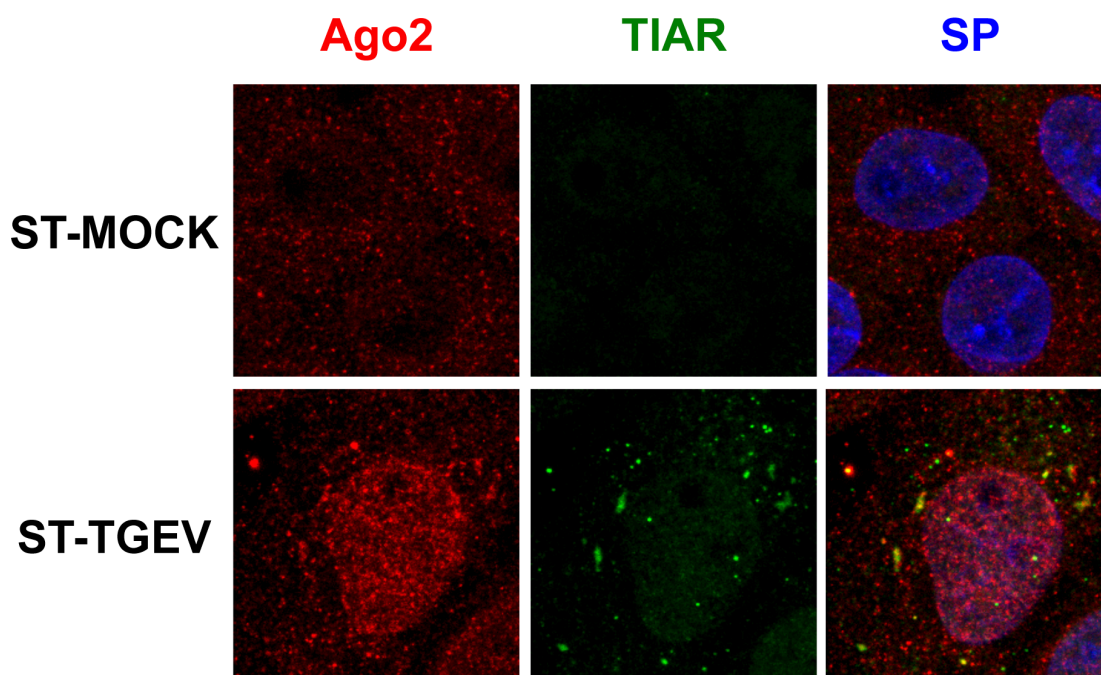
Se exploró si estas posibles interacciones RNA-RNA se establecían entre los svRNAs-nsp3.1 y svRNA-nsp3.2 y el miR-877-3p celular. Para ello, se realizó un ensayo funcional de expresión de luciferasa en células DBT-mACE2, transfectando plásmidos que expresaban el mRNA de un gen marcador con secuencias diana para el miR-877-3p, junto con RNAs miméticos del miR-877-3p y de los svRNAs nsp3.1 y nsp3.2 solos o con sus inhibidores antisentido específicos (Fig. 22D). Se comprobó que los RNAs miméticos del miR-877-3p disminuyeron hasta un 60% la actividad luciferasa, y que el inhibidor específico del miRNA restauraba parcialmente la expresión de luciferasa, confirmando el efecto represor del miR-877-3p. Para estudiar si los svRNA-nsp3.1 y svRNA-nsp3.2 actuaban como esponjas del miR-877-3p, impidiendo su unión al mRNA diana y su efecto represor de la expresión luciferasa, se co-transfectó el miR-877-3p con cada uno de los svRNA-nsp3.1 y svRNA-nsp3.2 miméticos. No se observó un aumento en los niveles de expresión de luciferasa respecto a la represión observada en presencia del miR-877-3p, como habría que esperar si svRNA-nsp3.1 y nsp3.2 tuvieran un efecto des-represor. Por el contrario, en presencia del svRNA-nsp3.1, se incrementó la represión de la luciferasa respecto a la observada con el miR-877-3p solo. De hecho, el svRNA-nsp3.1 por sí solo tenía cierto efecto represor de la expresión de luciferasa, que se revertía en presencia del inhibidor específico. Aunque no existe complementariedad significativa entre el svRNA-nsp3.1 y las secuencias diana del mRNA luciferasa, podrían existir otras interacciones RNA-RNA que explicaran esta inhibición. Estos resultados sugerían que en las condiciones experimentales utilizadas, los svRNA-nsp3.1 y svRNA-nsp3.2 no interferían en la función del miRNA celular miR-877-3p.



### 5.3. Localización del svRNA-N en células infectadas con el SARS-CoV

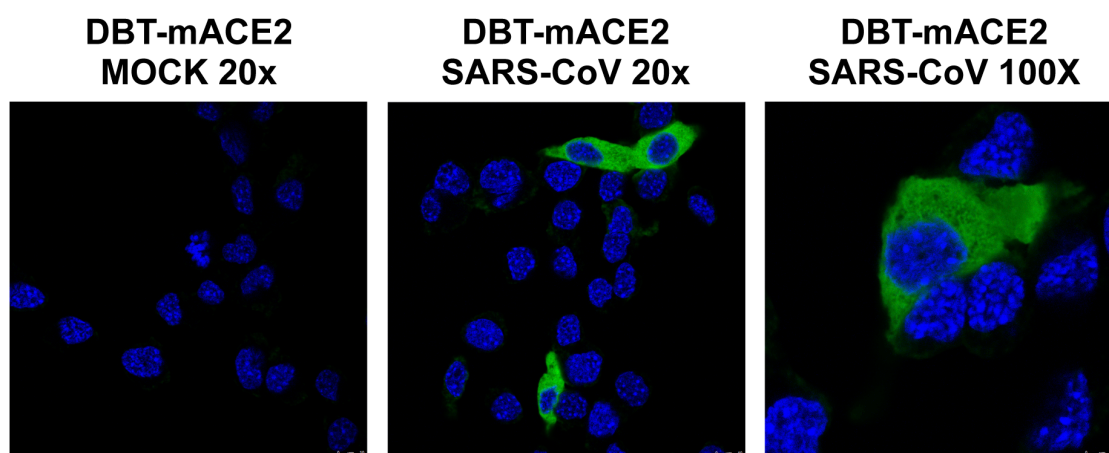
Para obtener información sobre la función del svRNA-N en la infección de SARS-CoV, se estudió su localización subcelular durante la infección y su posible interacción con proteínas celulares. Dado que el svRNA-N silenciaba la expresión de un mRNA marcador diana en la infección (Fig. 21C), podría tener un efecto represor sobre algún mRNA celular en el contexto de la interacción virus-hospedador. En la célula, el silenciamiento de mRNAs por miRNAs tiene lugar en el complejo RISC, que incluye la proteína Ago2, responsable del reconocimiento del miRNA y su mRNA diana y de la actividad endonucleolítica que lleva a la degradación del mRNA o la inhibición de la traducción (Fig. 3).

Dado que la infección por virus RNA puede inhibir la respuesta RNAi celular (Seo y col., 2013), se confirmó en primer lugar que la maquinaria celular de RNAi estaba activa durante la infección por SARS-CoV (Fig. 21B). Asimismo, resultados previos habían mostrado que durante la infección del CoV TGEV, la proteína Ago2, detectada por inmunofluorescencia, aumentaba su expresión en células ST y se localizaba tanto en el núcleo como en gránulos de estrés (SG) citoplasmáticos, co-localizando parcialmente con la proteína TIAR marcadora de estos gránulos (Fig. 23). En estas estructuras, se regula la expresión de mRNAs en respuesta a situaciones de estrés como es la infección viral.



**Figura 23. Detección de gránulos de estrés implicados en el silenciamiento postranscripcional de mRNAs en células ST infectadas con el CoV TGEV.** Detección por inmunofluorescencia de las proteínas Ago2 y TIAR asociadas al silenciamiento postranscripcional de mRNAs y gránulos de estrés, respectivamente, en las células infectadas con TGEV a mdi 1 a 8 hdi. SP, superposición.

Para visualizar los RNAs virales en células infectadas se optimizó la técnica de hibridación *in situ* (FISH) con sondas LNA marcadas con digoxigenina y detectadas por fluorescencia. En células DBT-mACE2 infectadas con SARS-CoV (mdi 1 y 24 hdi) una sonda complementaria al svRNA-N mostró al microscopio de fluorescencia una señal intensa y específica de la subpoblación de células infectadas (Fig. 24). Debido a la organización génica anidada característica de los CoVs, la secuencia de svRNA-N reconocida por la sonda se encontraba en el svRNA-N, y también en otras moléculas de RNA virales como el gRNA y todos los sgmRNAs, dado que el gen N es el último del genoma. Además, la señal estaba uniformemente distribuida por todo el citoplasma celular, por lo que no se podían diferenciar regiones subcelulares, como los complejos RISC, que incluyen a Ago2 y podrían incluir al svRNA-N. Por tanto, la técnica de FISH para detectar svRNAs en células infectadas por CoVs no permite diferenciar los svRNAs del resto de RNAs virales que incluyen esa secuencia. Sin embargo, puede ser de utilidad para determinar la localización de miRNAs celulares y, de forma complementaria a la técnica Ago-CLIP, se podrían identificar mRNAs diana para los miRNAs alterados en la infección por SARS-CoV y para los propios svRNAs (Scheel y col., 2016).



**Figura 24. Estudio de la localización del svRNA-N en células DBT-mACE2 infectadas por SARS-CoV por hibridación *in situ*.** Células DBT-mACE2 se infectaron con SARS-CoV wt a mdi 1. A las 24 h se fijaron con PFA para la detección del svRNA-N con una sonda específica de la secuencia viral unida a digoxigenina y anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a peroxidasa para el revelado posterior con fluorescencia verde. Imágenes tomadas al microscopio con aumentos 20x y 100x.

## 6. RELEVANCIA FUNCIONAL DEL svRNA-N EN LA INFECCIÓN DE RATONES CON SARS-CoV

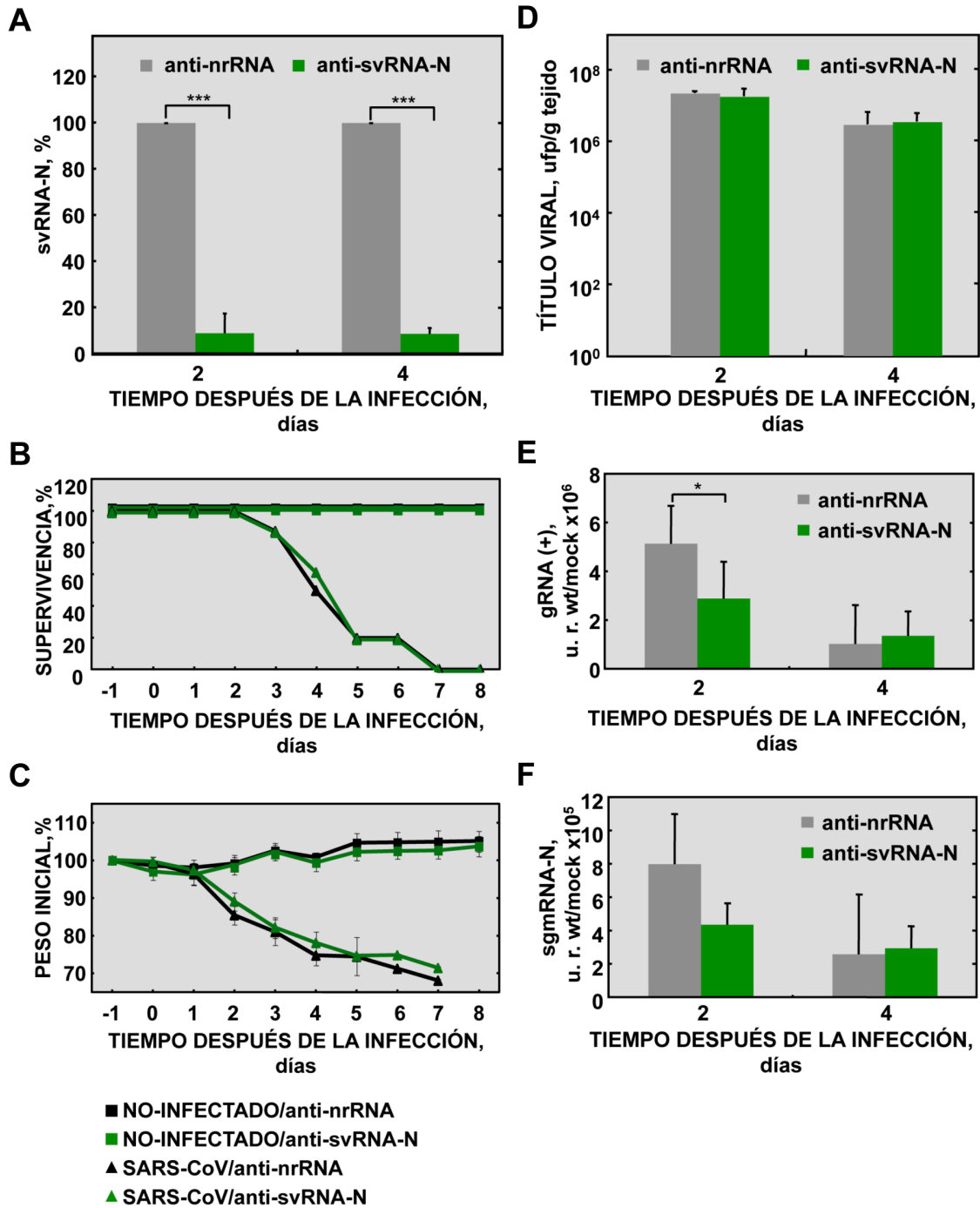
### 6.1. Inhibición con oligonucleótidos antisentido del svRNA-N en ratones infectados con SARS-CoV

El estudio funcional en cultivos celulares mostró que el svRNA-N generado en la infección con SARS-CoV silenciaba la expresión de un mRNA diana, por lo que podría estar implicado en la interacción virus-hospedador.

Dado que la regulación postranscripcional de la expresión génica es específica de tejido (Ludwig y col., 2016), se estudió la relevancia del svRNA-N en la infección por SARS-CoV *in vivo*, administrando a ratones un inhibidor antisentido (antagomir) específico del svRNA-N. En el momento de nuestro estudio, la única referencia encontrada en la literatura sobre inhibición de RNAs no codificantes pequeños en pulmones de animales describía la inhibición del miRNA-21, implicado en fibrosis pulmonar, con ácidos nucleicos LNA complementarios, administrados intratraquealmente en dosis sucesivas (Liu y col., 2010). Dado que SARS-CoV causa una infección pulmonar aguda, se administró intranasalmente una dosis única de 200 µg de inhibidor LNA complementario al svRNA-N 24 h antes de la inoculación del virus, para asegurar que las moléculas antisentido del anti-svRNA-N estaban presentes en las células del epitelio pulmonar antes de que se generase el svRNA-N en la infección. Para confirmar que el svRNA-N se había inhibido eficientemente en las condiciones experimentales utilizadas, se analizaron por RT-qPCR los niveles del svRNA-N en los pulmones de los ratones tratados con el inhibidor específico. La cantidad del svRNA-N disminuyó hasta el 10% de la cantidad presente en ratones inoculados con el inhibidor control negativo anti-nrRNA (Fig. 25A), tanto a día 2 como día 4 después de la infección, confirmando que el svRNA-N se había inhibido eficiente y específicamente y de forma sostenida en el curso de la infección. Para analizar el efecto de la inhibición del svRNA-N en la infección, se determinó la curva de peso y de supervivencia de los ratones a lo largo de una semana después de la infección. No se observó un aumento en la supervivencia de los ratones inoculados con el inhibidor de svRNA-N respecto al control negativo anti-nrRNA (Fig. 25B). Sin embargo, sí se observó que el tratamiento con anti-svRNA-N llevó a una pérdida de peso ligeramente menor que la administración del inhibidor control negativo (Fig. 25C), de forma sostenida en los 7 días después de la infección. Es posible que la supervivencia de los ratones pudiera aumentar si se incrementa la dosis o se mejora la pauta de administración del inhibidor, si bien estos experimentos tienen un coste muy elevado que limita su realización. Alternativamente, la acción del svRNA-N podría estar restringida a determinados aspectos de la interacción virus-hospedador. La

## Resultados

administración de los oligonucleótidos antisentido por inhalación a ratones no infectados no causó ningún efecto adverso observable dado que la inhalación es una técnica mínimamente invasiva. La eficacia de la inhibición con oligonucleótidos anti-svRNA-N y la seguridad de su administración confirmó que la inhalación de ácidos nucleicos antisentido es un procedimiento terapéutico prometedor frente a infecciones pulmonares.



**Figura 25. Efecto de la inhibición del svRNA-N en ratones infectados con SARS-CoV.** Se inocularon ratones BALB/c intranasalmente con 200 µg de inhibidor LNA anti-svRNA-N y se infectaron 24 h después con 10<sup>5</sup> ufp de SARS-CoV wt. Los ratones se sacrificaron a 2 y 4 ddi y se analizó el RNA y el título viral en pulmones. (A) Cuantificación de los niveles de svRNA-N por RT-qPCR en fracciones de RNAs de

pequeño tamaño. La cantidad de svRNA-N se calculó por el método  $\Delta\Delta Ct$  usando el snRNA-U6 como control endógeno y la cantidad en presencia del control negativo (nrRNA) como referencia, con valor de 100%. (B) Supervivencia de los ratones, expresada como porcentaje del número de ratones al inicio del experimento. (C) Pérdida de peso, expresado como porcentaje del peso de los ratones antes de empezar el experimento. (D) Títulos virales en los pulmones de los ratones normalizados por gramo de tejido homogeneizado. Cuantificación de los niveles de gRNA (E) y sgmRNA-N (F) del virus por RT-qPCR en la fracción de RNAs pulmonares > 200 nt. Los niveles se calcularon por el método  $\Delta\Delta Ct$  usando el rRNA 18s como control endógeno y los ratones no infectados (mock) como referencia con valor de 1. Se representan valores medios y sus desviaciones estándar. \*, p-valor<0,1; \*\*\*, p-valor<0,001.

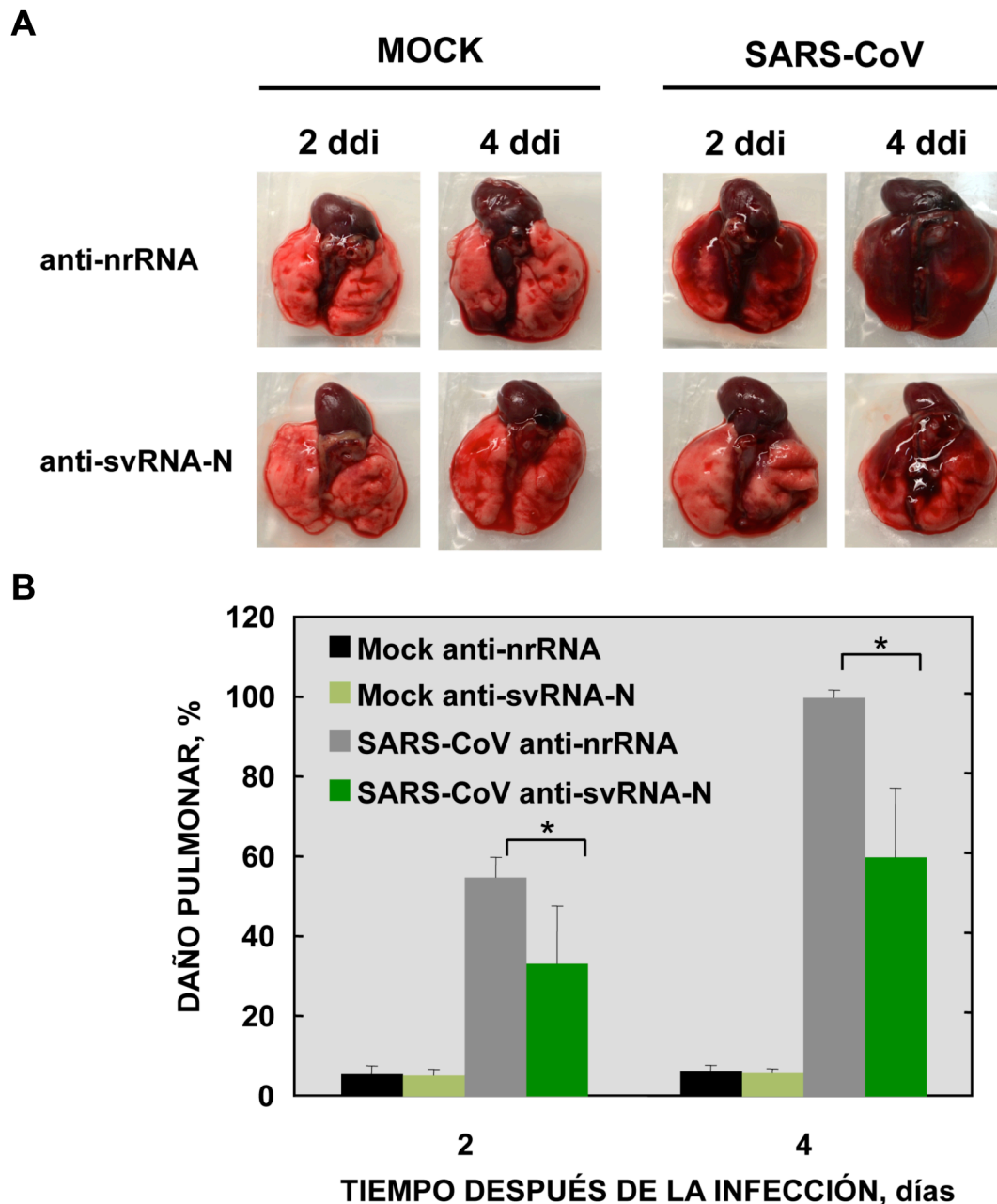
## **6.2. Efecto de la inhibición del svRNA-N en el crecimiento del virus en ratones infectados con SARS-CoV**

Se analizó si la inhibición del svRNA-N en la infección de ratones tenía efecto en el crecimiento del virus en los pulmones. No se observaron diferencias en los títulos virales en presencia o ausencia del inhibidor anti-svRNA-N a distintos días después de la infección (Fig. 25D). Estos resultados indicaban que en la infección *in vivo*, la inhibición de svRNA-N no limitaba el crecimiento del virus. Además, esta observación sugería que el inhibidor anti-svRNA-N, que potencialmente podría unirse a secuencias complementarias en el gRNA y los sgmRNAs, no tenía un efecto negativo sobre la producción viral.

Se analizaron por RT-qPCR los niveles del gRNA (+) y sgmRNA-N (+) virales (Fig. 25E y 25F) en los pulmones de los ratones a 2 y 4 ddi, como indicadores de la replicación viral. Se observó una reducción moderada (2 veces) en la cantidad de gRNA y sgmRNA-N a 2 ddi en los ratones infectados y tratados con el inhibidor anti-svRNA-N. Estos resultados sugerían que *in vivo*, el svRNA-N tenía un efecto positivo moderado en la replicación del virus, que no era suficiente para afectar al título viral. Probablemente en el organismo completo, a diferencia de los cultivos celulares en los que la inhibición del svRNA-N redujo el título viral, otros muchos factores intervienen en la interacción virus-hospedador, contribuyendo a que los efectos observados en el virus no sean idénticos.

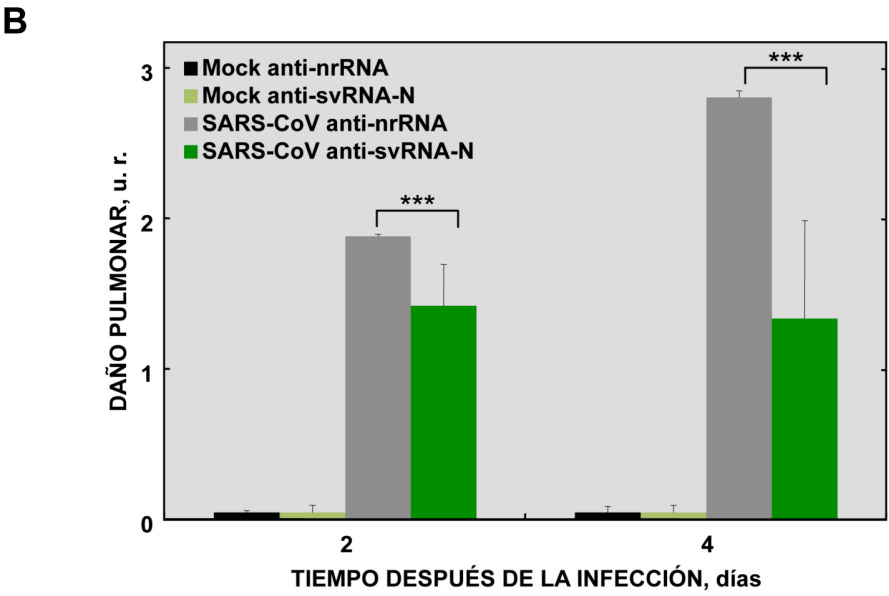
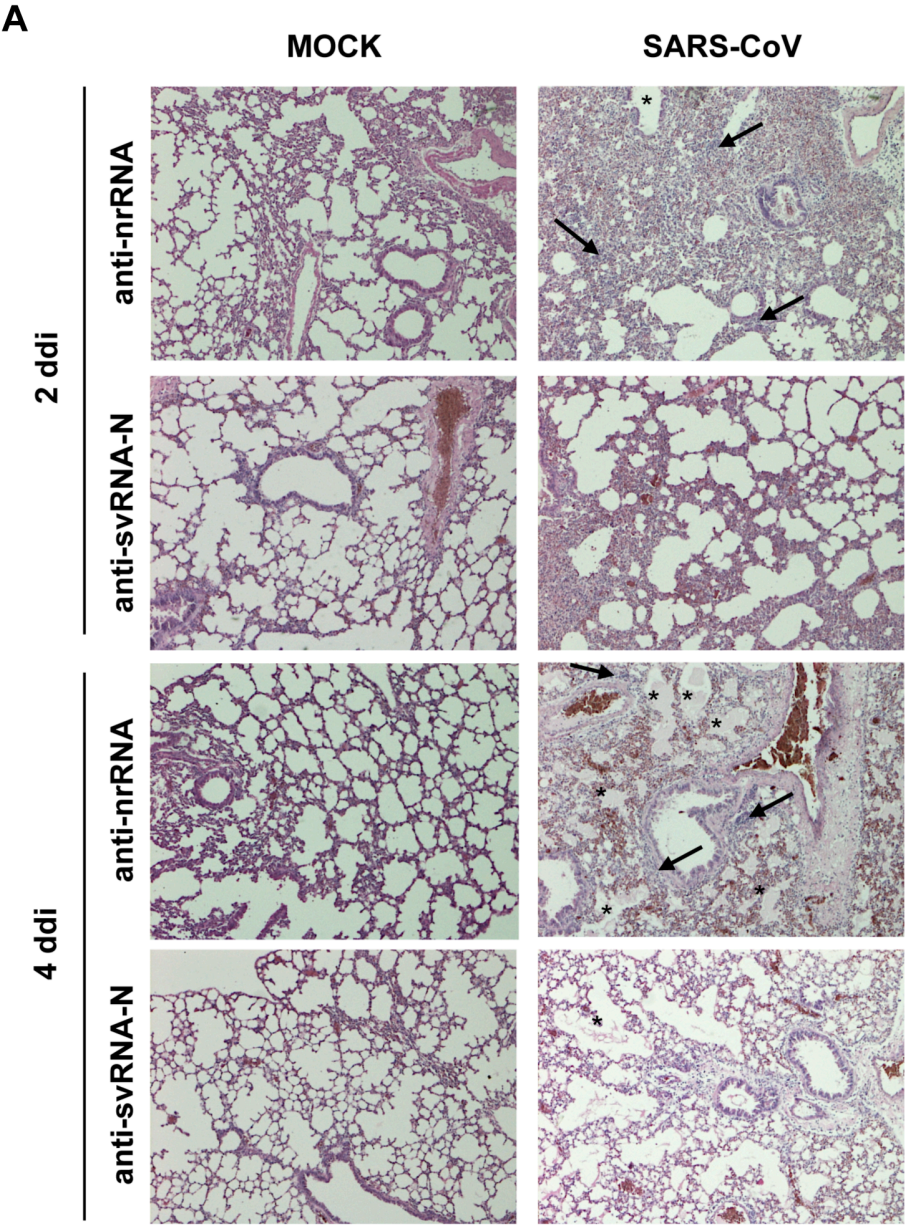
## **6.3. Efecto de la inhibición del svRNA-N en la patología causada por SARS-CoV en ratones**

Se estudió si el svRNA-N contribuía a la patología causada por el SARS-CoV en ratones. Para ello, se analizó el daño pulmonar macroscópico y la histopatología en ratones infectados y tratados con el inhibidor LNA anti-svRNA-N. Macroscópicamente, las lesiones hemorrágicas observadas en los pulmones tratados con el inhibidor control negativo se redujeron significativamente en presencia del inhibidor anti-svRNA-N, tanto a 2 como a 4 ddi (Fig. 26A y 26B) (Morales y col., 2017).



**Figura 26. Efecto de la inhibición del svRNA-N en ratones infectados con SARS-CoV en la patología pulmonar macroscópica.** El svRNA-N se inhibió en ratones BALB/c con LNA anti-svRNA-N 24 h antes de la infección con SARS-CoV wt, como se explica en la Figura 25. (A) Imágenes representativas de las lesiones pulmonares macroscópicas que presentaron los ratones tratados con el inhibidor control negativo (anti-nrRNA) o con el inhibidor del svRNA-N (anti-svRNA-N) e infectados con el SARS-CoV a 2 y 4 ddi. (B) Cuantificación del porcentaje del área del pulmón afectada por lesiones hemorrágicas externas. Se representan valores medios y sus desviaciones estándar. \*, p-valor<0,1.



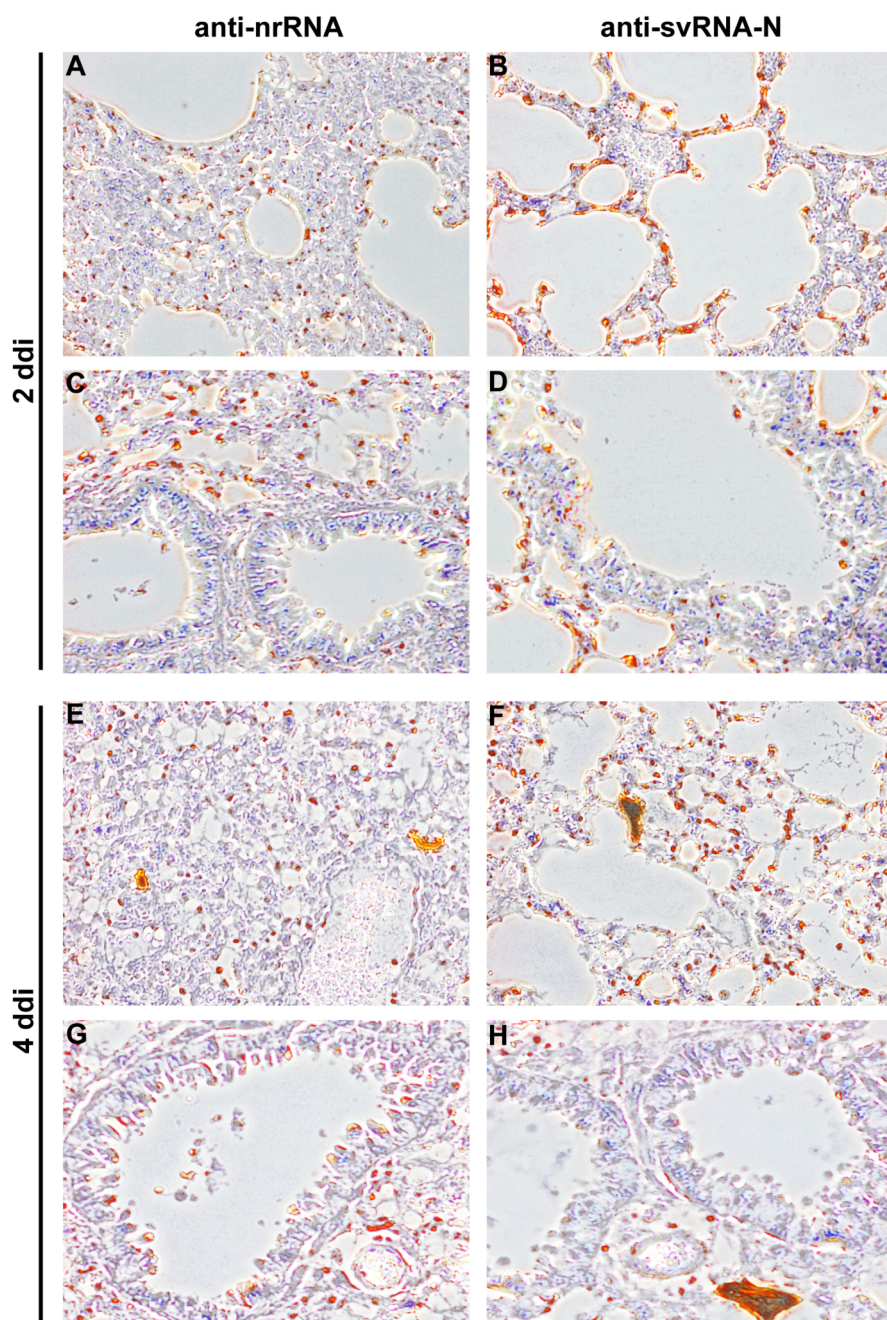


**Figura 27. Efecto de la inhibición del svRNA-N en ratones infectados con SARS-CoV en la histopatología pulmonar.** El svRNA-N se inhibió en ratones BALB/c con LNA anti-svRNA-N 24 h antes de la infección con SARS-CoV wt, como se explica en la Figura 25. (A) Análisis histopatológico de secciones de pulmones de ratones teñidas con hematoxilina-eosina a 2 y 4 ddi. \*, edema pulmonar; flechas, infiltrados pulmonares de células inflamatorias; anti-nrRNA, inhibidor control negativo. (B) Cuantificación del daño histológico en unidades relativas del 1 al 3 atendiendo a presencia de inflamación intersticial, peribronquiolar y perivascular. Se observaron 50 campos aleatorios por cada pulmón de ratón. Se representan valores medios y sus desviaciones estándar. \*\*\*, p-valor<0,001.

La histopatología pulmonar se estudió en secciones de tejido teñidas con hematoxilina-eosina. Se confirmó que los ratones no infectados, tanto tratados con el inhibidor control negativo como con anti-svRNA-N, no presentaban daño pulmonar significativo y mantuvieron los espacios alveolares libres a 2 y 4 ddi (Fig. 27A), lo que confirmaba la ausencia de efectos secundarios asociados a la administración de inhibidores LNA. Por el contrario, en los pulmones de ratones infectados y tratados con el control negativo se observó desde el día 2 di y en mayor medida a 4 ddi un aumento significativo del edema, en forma de: (i) depósitos de material y restos celulares dentro de los espacios alveolares; e (ii) infiltrados de células inflamatorias en la región intersticial, peribronquioalveolar y perivascular (Fig. 27A). En conjunto, estos cambios histopatológicos impiden el intercambio gaseoso en los alveolos y comprometen la función pulmonar, causando finalmente la muerte. El daño pulmonar se cuantificó de acuerdo con criterios establecidos anteriormente (Page y col., 2012), con valores entre 0 y 3 atendiendo al grado de la inflamación intersticial, peribronquioalveolar o perivascular. De acuerdo con la observación macroscópica, se confirmó una reducción significativa en la histopatología pulmonar de los ratones infectados y tratados con el inhibidor anti-svRNA-N a día 2 y especialmente a día 4 di (Fig. 27B).

Se analizó si la inhibición del svRNA-N causaba un cambio en la distribución pulmonar del virus durante la infección, utilizando técnicas de inmunohistoquímica con un anticuerpo que reconoce la proteína N del SARS-CoV (Fig. 28). No se observaron cambios en la localización del virus en el parénquima pulmonar ni en las regiones peribronquiolares como consecuencia del tratamiento con el anti-svRNA-N, por lo que el efecto protector del inhibidor no se puede atribuir a un cambio en la distribución de la infección en los tejidos pulmonares. La disminución del edema y los infiltrados celulares característicos de la inflamación pulmonar causada por SARS-CoV en ratones indicaba que el inhibidor anti-svRNA-N tenía un efecto antiinflamatorio.

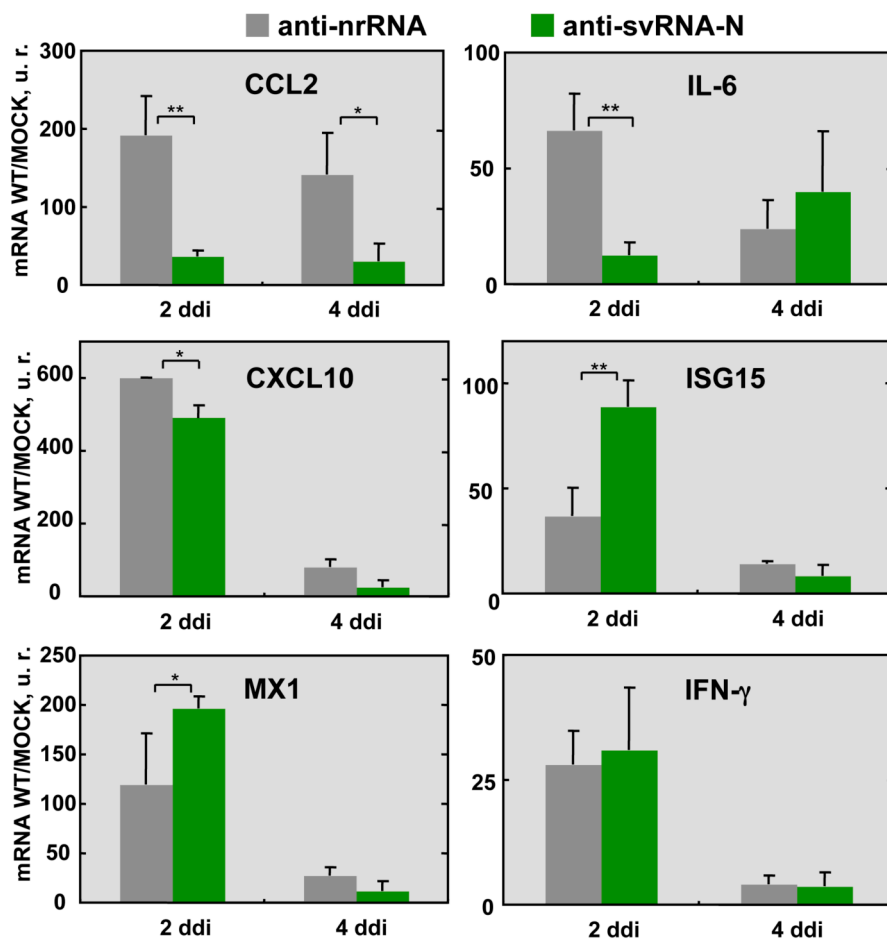




**Figura 28. Efecto de la inhibición del svRNA-N en la distribución pulmonar de la infección del SARS-CoV en ratones.** Detección por inmunohistoquímica de la proteína N del SARS-CoV en las secciones de pulmón de los ratones. Se muestran imágenes del parénquima pulmonar (A, B, E y F) y de bronquiolos (C, D, G y H) a 2 y 4 ddi en ratones tratados con el inhibidor anti-svRNA-N o con el control negativo (anti-nrRNA).

Para caracterizar el efecto protector del inhibidor anti-svRNA-N en los pulmones de los ratones, se determinaron mediante RT-qPCR los niveles de mRNAs celulares relacionados con la respuesta inmune innata. La expresión de los mRNAs de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias CCL2, IL-6 y CXCL10 asociadas con la infección por SARS-CoV se redujo significativamente en los pulmones de los ratones infectados en presencia del inhibidor anti-svRNA-N, tanto a día 2 como a día 4 di, de

acuerdo con la menor inflamación observada (Fig. 29). Por otra parte, los mRNAs de genes de la respuesta antiviral estimulados por interferón como ISG15, regulador de la respuesta inflamatoria, y el mediador antiviral MX1, aumentaron significativamente a 2 ddi en los pulmones de los ratones tratados con el inhibidor de svRNA-N análogamente a la observación realizada en ratones infectados con el virus Chikungunya de que la reducción en los niveles de ISG15 se asociaba con el aumento en las citoquinas pro-inflamatorias (Werneke y col., 2011). Las variaciones en la expresión de mRNAs en ratones tratados con el anti-svRNA-N fueron específicas, porque no todos los mRNAs relacionados con la respuesta antiviral cambiaron su expresión en presencia de este inhibidor. No se detectaron variaciones en los niveles del mRNA de IFN- $\gamma$ , cuya expresión aumenta en la infección por SARS-CoV (Frieman y Baric, 2008), lo que sugiere que el inhibidor de svRNA-N no tuvo un efecto generalizado en la expresión génica en pulmón.



**Figura 29. Efecto de la inhibición de svRNA-N en ratones infectados con SARS-CoV en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias.** Cuantificación por RT-qPCR del mRNA de citoquinas pro-inflamatorias y mediadores antivirales de los pulmones de los ratones. Los niveles de mRNA se calcularon por el método  $\Delta\Delta C_t$  usando el rRNA 18s como control endógeno y los ratones no infectados (mock) como

referencia, con valor de 1. Se representan valores medios y sus desviaciones estándar. \*, p-valor<0,1; \*\*, p-valor<0,01.

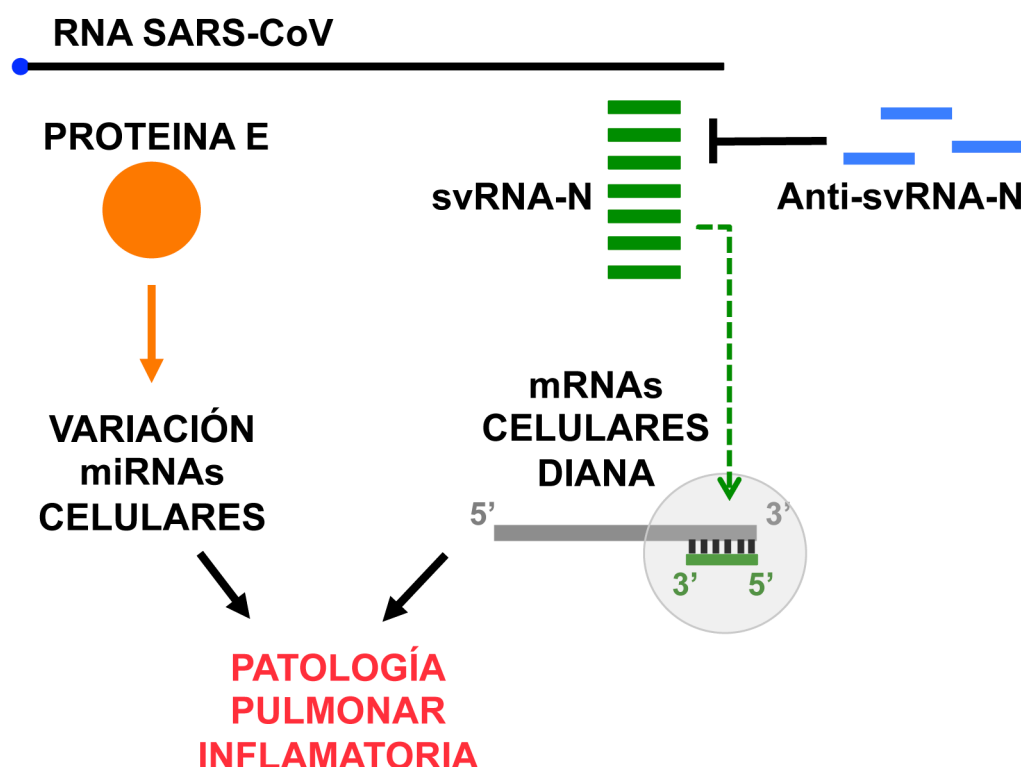
La inhibición de los niveles de svRNA-N redujo la patología pulmonar y la expresión de citoquinas pro-inflamatorias (Morales y col., 2017). Sin embargo, no fue suficiente para aumentar la supervivencia de los ratones, lo que sugiere que el svRNA-N tiene una contribución parcial en la inflamación pulmonar, junto con otros factores virales implicados en la activación de la respuesta inflamatoria exacerbada característica del SARS-CoV, como se ha demostrado en trabajos previos de nuestro laboratorio (Jimenez-Guardeño y col., 2014; Nieto-Torres y col., 2014) y de otros grupos (Frieman y Baric, 2008; Kindler y col., 2016). Por tanto, la inhibición del svRNA-N como estrategia antiviral debería ser complementaria a otras terapias para asegurar la máxima eficacia y seguridad frente a la infección por SARS-CoV.

## **7. BÚSQUEDA *IN SILICO* DE DIANAS POTENCIALES PARA LOS RNAs PEQUEÑOS DERIVADOS DE SARS-CoV**

Se ha mostrado la capacidad del svRNA-N para reprimir la expresión de un mRNA marcador con secuencias diana durante la infección por SARS-CoV (Fig. 21). Además, *in vivo*, el svRNA-N promueve la inflamación en los pulmones de ratones infectados por SARS-CoV (Fig. 26, 27 y 29). Por tanto, nos preguntamos si este svRNA-N podría tener como diana algún mRNA de ratón implicado en la regulación de la respuesta inflamatoria antiviral. Como el svRNA-N no está anotado en las bases de datos más comunes de miRNAs, no ha sido posible utilizar las herramientas convencionales de predicción de dianas para miRNAs. Por ello, se ha utilizado una herramienta de predicción de dianas alternativa (*RNAhybrid*) (Rehmsmeier y col., 2004), que permite buscar dianas potenciales del svRNA en una base de datos personalizada. Dado que no se disponía de información previa sobre posibles dianas del svRNA-N o sobre el modo de interacción entre el svRNA y su diana, se decidió utilizar en este estudio el genoma del ratón completo, utilizando como parámetros mínimos para la búsqueda de interacciones una energía libre de -25 kcal/mol y un número de nt implicados de 7. Sin embargo, con estos criterios se obtuvieron 27.352 dianas potenciales en el genoma de ratón, incluyendo secuencias codificantes y no codificantes. Con la información disponible actualmente, no es posible filtrar falsos resultados positivos hasta obtener un menor número de dianas con las que continuar el estudio y validar el mecanismo por el que el svRNA-N incrementa la inflamación de los pulmones infectados con SARS-CoV.

## 8. MECANISMO DE ACCIÓN POSTULADO PARA EL FUNCIONAMIENTO DE RNAs PEQUEÑOS NO CODIFICANTES EN LA INFECCIÓN DE PULMONES DE RATÓN POR SARS-CoV

Con los resultados obtenidos, se ha propuesto un modelo para explicar la función de RNAs pequeños no codificantes en la infección del SARS-CoV *in vivo* (Fig. 30). El svRNA-N demostró su capacidad para reprimir la expresión de un gen marcador con secuencias diana durante la infección de cultivos celulares (Fig. 21). Además, la administración de un inhibidor específico del svRNA-N a ratones infectados, disminuyó significativamente la patología pulmonar, al reducir el edema y los infiltrados celulares, aunque no redujo significativamente la replicación del virus (Fig. 25, 26 y 27). Esta observación histopatológica se correspondía con la caída en los niveles de mRNAs de citoquinas pro-inflamatorias como CCL2, IL-6 y CXCL10 y con el aumento de moduladores antivirales ISG15 y MX1 (Fig. 29). El mecanismo molecular por el que el svRNA-N incrementa la inflamación pulmonar podría implicar la represión postranscripcional de mRNAs celulares que contribuyen a resolver la inflamación causada por el SARS-CoV (Fig. 30), aunque no pueden excluirse otros mecanismos que impliquen la interacción del svRNA-N con proteínas (Bidet y col., 2014).



**Figura 30. Modelo de la función de RNAs no codificantes, celulares y virales, durante la infección de SARS-CoV.** La presencia de la proteína E del SARS-CoV afecta a la expresión de miRNAs celulares durante la infección cuyos mRNAs diana validados están implicados en la patología pulmonar inflamatoria. Además, el SARS-CoV genera svRNAs como el svRNA-N que reprime la expresión de genes

diana durante la infección, sugiriendo un papel como regulador postranscripcional de mRNAs celulares diana. La inhibición del svRNA-N en ratones infectados redujo la inflamación que el SARS-CoV promueve en los pulmones y los niveles de citoquinas pro-inflamatorias, sugiriendo que los mRNAs reprimidos por el svRNA-N estarían implicados en la regulación de la inflamación pulmonar.

Los posibles mRNAs diana de los miRNAs diferencialmente expresados en la infección de los ratones con el virus atenuado respecto al virulento estaban relacionados con la inflamación severa producida por el virus en presencia de la proteína E. Por tanto, la proteína E estaría contribuyendo a la patología inflamatoria pulmonar en parte a través de cambios en los niveles de miRNAs celulares que regulan procesos inflamatorios (Fig. 30).



## DISCUSIÓN

---





En esta tesis se ha estudiado la interacción del SARS-CoV con el hospedador desde la perspectiva de los ncRNAs tanto celulares como virales. Los ncRNAs contribuyen a la regulación de diversas funciones tanto en la fisiología normal de los organismos como en la enfermedad (Bushati y Cohen, 2007; O'Connell y col., 2012). Se han descrito ncRNAs en organismos eucariotas, pero también en bacterias (Oliva y col., 2017) y virus (Harris y col., 2013), con funciones importantes en la regulación de la expresión génica. Sin embargo, el conocimiento de su relevancia en la patogénesis viral es todavía limitado (Trobaugh y Klimstra, 2017). Las nuevas técnicas de detección de RNAs, como la secuenciación masiva, han permitido identificar un número cada vez mayor de ncRNAs. Sin embargo, el principal reto actualmente es identificar su función biológica y conocer su mecanismo de acción. En particular, el presente trabajo se ha centrado en el estudio de dos poblaciones de ncRNAs: (i) Los miRNAs celulares y su contribución a la respuesta antiviral del hospedador; y (ii) Los ncRNAs derivados del genoma del SARS-CoV, svRNAs, y su relevancia en la biología del propio virus y en la patología pulmonar. El análisis de nuevos mecanismos de interacción del virus con el hospedador como los ncRNAs abre nuevas posibilidades en el desarrollo de antivirales cuyas dianas sean moléculas de RNA específicas.

Para estudiar estos aspectos se ha utilizado un modelo de infección *in vivo* del SARS-CoV en el que ratones convencionales se infectan con un virus SARS-CoV adaptado a ratón (Roberts y col., 2007). Este modelo animal reproduce la patología pulmonar inflamatoria severa (ARDS) y la mortalidad características de la infección del SARS-CoV en humanos y permite estudiar la relevancia fisiológica de los ncRNAs en el contexto natural de infección del hospedador, en presencia del conjunto de factores celulares (RNAs y proteínas) y de la respuesta inmune innata (Cox y Sullivan, 2014; Vidigal y Ventura, 2015).

Para determinar más específicamente qué ncRNAs están implicados en la patología inflamatoria causada por el SARS-CoV se infectaron ratones con dos virus SARS-CoV generados en nuestro laboratorio, que solo diferían en la expresión de un factor de virulencia, la proteína E (DeDiego y col., 2007). El virus silvestre inducía inflamación pulmonar severa y aguda, que llevó a la muerte de los animales infectados, mientras que el virus  $\Delta E$  estaba atenuado y no causó inflamación pulmonar ni la muerte de los ratones (Fig. 5). Por tanto, las diferencias observadas en ambas situaciones experimentales en el transcriptoma pulmonar, tanto RNAs no codificantes como mRNAs, estaban asociadas a los procesos celulares responsables de la patogénesis viral.

## **1. ncRNAs DEL HOSPEDADOR EXPRESADOS EN PULMONES DE RATONES INFECTADOS POR SARS-CoV**

Más del 90% de las secuencias de RNA de pequeño tamaño obtenidas en la secuenciación masiva de los pulmones de ratón eran idénticas a secuencias del genoma de ratón (Fig. 8), de forma similar a lo observado en otras infecciones de virus RNA (Parameswaran y col., 2010; Perez y col., 2010; Shi y col., 2014). Gran parte de estas secuencias (70-80%) tenían 22-23 nt de longitud (Fig. 7), coincidiendo con el tamaño medio de los miRNAs en células de mamífero (Bushati 2007). Prácticamente todas las secuencias (98%) se asignaron a 5.208 *loci* del genoma de ratón (Tabla VII), de los que solo una pequeña parte (593) eran miRNAs conocidos de esta especie (*miRBase*). El resto de las secuencias correspondía a otros ncRNAs de pequeño tamaño como snRNAs, snoRNAs, piRNAs y tRNAs, además de productos de degradación de RNAs largos como rRNAs, lncRNAs, transcritos de genes que codifican proteínas (exones e intrones) y de secuencias intergénicas. Además de los miRNAs ya anotados en bases de datos, se encontraron secuencias de RNAs que alineaban en el genoma de ratón con la distribución bimodal característica de los precursores de miRNAs (Fig. 10), por lo que previsiblemente eran miRNAs (Burke y col., 2015; Tav y col., 2016). Su confirmación y la anotación como miRNAs requiere que cumplan criterios estructurales y funcionales adicionales (Hansen y col., 2011; Huntley y col., 2016). Probablemente, la profundidad del análisis realizado sobre la expresión génica en los pulmones de ratón infectados por SARS-CoV nos ha permitido la identificación de nuevos ncRNAs de ratón.

Para el estudio funcional de los miRNAs es fundamental el conocimiento de dianas potenciales, lo que permitiría determinar su relevancia en la infección por SARS-CoV. Sin embargo, la mayoría de los programas de predicción de dianas necesitan que los miRNAs estén anotados (Peterson y col., 2014). Por tanto, de todos los ncRNAs de pequeño tamaño identificados en las infecciones por SARS-CoV, nuestro interés se ha centrado en el análisis de miRNAs anotados, que son los más estudiados y para los que existen más herramientas disponibles. No obstante, en el futuro se anotarán nuevos miRNAs para poder buscar sus mRNAs diana en las bases de datos y determinar su función en la infección por SARS-CoV

## **2. ncRNAs DEL HOSPEDADOR DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN LA INFECCIÓN POR SARS-CoV-ΔE ATENUADO O SARS-CoV VIRULENTO**

El análisis de la expresión diferencial de ncRNAs pequeños del hospedador confirmó que los RNAs con mayores variaciones eran también los menos abundantes en número de lecturas (Fig. 11). Se ha estimado que para que un miRNA tenga

relevancia funcional debe estar presente en un número significativo de células y en un número de moléculas por célula superior a 100 (tenOever, 2013). Por tanto, los criterios para seleccionar miRNAs potencialmente relevantes en la virulencia de SARS-CoV debían incluir no solo variaciones significativas en su expresión, sino también una mínima abundancia en el pulmón de ratón.

Con estos criterios, se observó un número elevado (190) de ncRNAs diferencialmente expresados en los pulmones infectados con el virus atenuado o virulento a 2 ddi (Fig. 11). Estas diferencias serían atribuibles al efecto específico de la proteína E como factor de virulencia en el pulmón. Por el contrario, el número de ncRNAs pequeños expresados de forma diferente entre las muestras infectadas con el virus atenuado o no infectadas fue relativamente pequeño (50), confirmando que la infección por el virus atenuado tenía menor impacto en el hospedador. En principio, hubiéramos esperado que entre las muestras infectadas con el virus virulento o no infectadas, el número de ncRNAs diferencialmente expresados fuera significativamente más alto que en las comparaciones anteriores, al reflejar los cambios profundos en la expresión génica inducidos por el virus. Sin embargo, las diferencias en número observadas resultaron ser más discretas (127), posiblemente porque las réplicas biológicas de los ratones no infectados mostraron una variabilidad en la expresión de ncRNAs mayor que la observada entre los animales infectados. Es posible que la infección viral, tanto con el virus atenuado como virulento, indujera en el hospedador una respuesta dominante en la expresión de ncRNAs, como parte de la respuesta antiviral general. Por el contrario, en los ratones no infectados la expresión de ncRNAs pequeños sería más variable al no existir una respuesta antiviral unificadora.

Entre los ncRNAs pequeños, la infección por SARS-CoV modifica la expresión en el pulmón de miRNAs con respecto a los ratones no infectados (Tabla VIII), como se ha descrito previamente (Peng y col., 2011) y como se ha observado en otros virus RNA como enterovirus (Ho y col., 2016) o el virus de la gripe (Wu y col., 2013). Algunos de los miRNAs identificados en nuestro análisis como diferencialmente expresados en la infección por SARS-CoV atenuado respecto al virus virulento, como miR-223-5p, miR-223-3p, miR-107-3p, miR-30c-1-3p y miR-877-5p confirman los resultados descritos en infecciones de distintos modelos murinos (Peng y col., 2011). Los enterovirus promueven variaciones en los niveles de algunos miRNAs implicados en la respuesta antiviral y la apoptosis (Ho y col., 2016), mientras que el virus de la gripe induce cambios en la expresión de miRNAs celulares cuyas dianas se relacionan con la vía de señalización de TGF- $\beta$  (Wu y col., 2013).

En plantas y organismos inferiores como artrópodos y nematodos, el sistema RNAi constituye la principal defensa antiviral. En mamíferos, la existencia del sistema de IFN para responder a infecciones virales ha suscitado la duda del requerimiento o no de la función RNAi (tenOever, 2016). La infección con el virus Sendai promueve la ADP-ribosilación del sistema RISC, inactivando la vía de RNAi (Seo y col., 2013), mientras que en otras infecciones virales se han demostrado cambios en el patrón de expresión de miRNAs celulares que modulan la respuesta antiviral (Harris y col., 2013; Trobaugh y Klimstra, 2017). En la infección por SARS-CoV, era factible temporalmente que los miRNAs contribuyeran a la regulación de la respuesta antiviral, dado que el ciclo viral es relativamente lento (24-48 h) y los miRNAs requieren de 4-6 h para su procesamiento y función (tenOever, 2013). En esta memoria se muestra que el sistema RNAi está activo en la infección por SARS-CoV (Fig. 21B) y que hay un cambio en la expresión de miRNAs en los pulmones de ratones infectados (Fig. 11-13 y Tablas VIII y IX).

### **2.1. Predicción de potenciales mRNAs diana de los miRNAs diferencialmente expresados en la infección con el virus atenuado SARS-CoV-ΔE y virulento SARS-CoV**

En general, en la literatura y en las bases de datos existe un sesgo en la información asociada a un número limitado de miRNAs, los más intensamente estudiados. En consecuencia, la predicción de dianas de miRNAs también estará sesgada hacia aquellos miRNAs mejor caracterizados lo que explicaría que sólo se identificaron mRNAs diana validados para algunos (5 de 23) de los miRNAs diferencialmente expresados en la infección con el virus atenuado o virulento.

Las dianas potenciales de los miRNAs diferencialmente expresados en la infección por SARS-CoV atenuado o virulento pertenecían a grupos funcionales relacionados con inflamación. De ellos, el más representado era la ruta de señalización de inflamación mediada por citoquinas y quimioquinas (Fig. 13), en consonancia con anteriores trabajos del laboratorio que demuestran que la proteína E de SARS-CoV es un factor de virulencia responsable de la respuesta inflamatoria excesiva y patogénica (Jimenez-Guardeño y col., 2014; Regla-Nava y col., 2015). Otras rutas de señalización celulares con las que se relacionaron los genes diana validados de miRNAs diferencialmente expresados también estaban implicadas en la regulación de la inflamación, como CCKR, que activa la proteína p38 MAPK (Dufresne y col., 2006). Precisamente, la inducción de p38 MAPK, mediada por la interacción entre el motivo PBM de la proteína E y el dominio PDZ de la sintenina, resultó ser crítica en la

virulencia de SARS-CoV, como se describió en nuestro laboratorio (Jimenez-Guardeño y col., 2014).

La vía de la hormona GNRH, cuya liberación está estimulada por las citoquinas pro-inflamatorias IL-6 e IL-1 $\beta$  (Igaz y col., 2006; Kass y col., 2015), incluye genes potencialmente regulados por miRNAs diferencialmente expresados. Las citoquinas IL-6 e IL-1 $\beta$  están sobre-expresadas en la infección con el SARS-CoV virulento, como consecuencia de la activación del inflamasoma por la proteína E (Nieto-Torres y col., 2014).

Por otra parte, un buen número de genes diana de los miRNAs diferencialmente expresados en presencia o ausencia de la proteína E estaban relacionados con las vías de señalización celular PI3K y EGF, que incluyen una cascada de quinasas que activan a NF- $\kappa$ B (Igaz y col., 2006; Kass y col., 2015), responsable de la transcripción de citoquinas pro-inflamatorias. La activación de NF- $\kappa$ B se ha demostrado que es relevante en la inflamación pulmonar y la virulencia dependientes de la proteína E (DeDiego y col., 2014). En conjunto, las predicciones de dianas potenciales para miRNAs pulmonares asociados a la patología causada por SARS-CoV coinciden bastante bien con el conocimiento previo de los mecanismos de patogénesis de la proteína E. Esto sugiere que las interacciones entre miRNAs y mRNAs diana podrían contribuir a la inflamación inducida por la proteína E. Se ha descrito que en respuesta a infecciones virales los miRNAs pueden modular la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, como IL-6, IL-1 $\beta$ , CCL2, CXCL2 (Aguado y col., 2015), como sucede en la fase aguda de la infección del virus de la gripe.

La regulación de la respuesta inflamatoria por miRNAs ha sido muy estudiada y, de hecho, su desregulación es causa de algunas enfermedades inflamatorias como lupus o esclerosis múltiple (O'Connell y col., 2012). Los miRNAs afectan a la respuesta inflamatoria a través de la regulación de la expresión de citoquinas (Asirvatham y col., 2009), nodos de transducción de señales (Inui 2010) y receptores TLR (O'Neill 2011). Además, los cambios en la expresión de miRNAs en los tejidos afectados por procesos inflamatorios suelen deberse a la producción de miRNAs inflamatorios por infiltrados de células del sistema inmune (O'Connell y col., 2012; O'Neill y col., 2011; Peng y col., 2011). Por tanto, no podemos excluir que algunos cambios en la expresión de miRNAs en los pulmones de ratones infectados por SARS-CoV tengan su origen en las células inflamatorias infiltradas y no en las propias células infectadas.

Ahora bien, el mecanismo preciso de esta regulación está por determinar, dada la complejidad de las interacciones entre miRNAs y mRNAs. En muchos casos, los miRNAs regulan genes clave en múltiples rutas celulares, de forma que aunque los cambios en los niveles de expresión de genes individuales sean discretos, su acción

cooperativa produce finalmente un efecto biológico relevante (Hausser y Zavolan, 2014; Inui y col., 2010).

### **2.2. Estudio integrado de mRNAs y miRNAs diferencialmente expresados en la infección con el SARS-CoV virulento y el atenuado**

La regulación postranscripcional por miRNAs reprime la expresión de mRNAs diana por la actividad del complejo RISC (Bushati y Cohen, 2007). Por tanto, se esperaría una correlación inversa entre los niveles de miRNA y sus mRNAs diana (Vlachos y col., 2016). El estudio integrado de mRNAs y miRNAs diferencialmente expresados en pulmón en la infección con el virus SARS-CoV virulento o atenuado permitiría identificar mRNAs diana modulados por los miRNAs. Sin embargo, esta aproximación tiene limitaciones (Fabian y Sonenberg, 2012), porque algunos mRNAs diana (16%) se reprimen postranscripcionalmente sin degradación del mRNA (Ameres y Zamore, 2013), dependiendo del contexto celular (Vidigal y Ventura, 2015), por lo que no se observarían cambios en los niveles de mRNA, sino únicamente reducción en la cantidad de proteína (Baek y col., 2008).

Además, la regulación por miRNAs implica redes complejas de interacciones combinatoriales de forma que un mismo mRNA puede ser diana de distintos miRNAs y a su vez, el mismo miRNA puede actuar sobre centenares de mRNAs diana (Bueno y col., 2011; Coronello y col., 2012; Wilczynska y Bushell, 2015). Se ha descrito incluso que la competición de muchos miRNAs para unirse a un determinado mRNA puede inhibir el efecto represor y llevar al aumento de la expresión del mRNA (Nyayanit y Gadgil, 2015). Todo ello dificulta aún más el estudio de la función de los miRNAs a través de los cambios de expresión de sus mRNAs diana.

El análisis de la expresión de RNAs largos en los pulmones de ratones infectados con el virus atenuado o virulento confirmó que en ausencia de la proteína E, los mRNAs que mayoritariamente disminuyeron su expresión correspondían a citoquinas, quimioquinas y sus receptores, y en general aquellos relacionados con la respuesta inmune innata inflamatoria y la defensa frente a virus (Fig. 14B). Estos resultados confirmaban que la proteína E era un determinante de la inflamación en la infección del SARS-CoV (DeDiego y col., 2014; Jimenez-Guardeño y col., 2014; Nieto-Torres y col., 2014).

Por otra parte, la ausencia de la proteína E promovió la sobre-expresión de genes (Fig. 14A) implicados en el transporte de iones y en particular el ión  $\text{Ca}^{2+}$ . La proteína E tiene actividad canal iónico (Nieto-Torres y col., 2011) y en la infección por SARS-CoV interviene en el transporte de iones  $\text{Ca}^{2+}$ , reguladores de múltiples funciones celulares, en particular la activación del inflammasoma (Nieto-Torres y col., 2014; Nieto-

Torres y col., 2015). Otros genes sobre-expresados en ausencia de la proteína E estaban relacionados con la unión a proteínas, la transducción de señales y la adhesión celular. Los motivos PBM, como el que está presente en el carboxilo terminal de la proteína E, están implicadas en la unión a dominios PDZ para formar complejos proteína-proteína implicados en la transducción de señales y en las uniones estrechas entre células (Jimenez-Guardeño y col., 2014; Teoh y col., 2010).

En particular, algunos de los mRNAs de rutas inflamatorias (Mef2c e Irs1) identificados como dianas de los miR-223-3p y miR-145a-5p, respectivamente, estaban sobre-expresados en los pulmones infectados con el virus atenuado respecto al virulento, de acuerdo con la disminución de la expresión de miRNAs 223-3p y 145a-5p (Tablas IX y X). Por tanto, el estudio comparado de los niveles de mRNAs y miRNAs puede proporcionar información sobre potenciales mRNAs diana, aunque muchas de las interacciones pueden pasar desapercibidas en la compleja red de regulación.

### **2.3. Nuevas aproximaciones en la identificación de mRNAs diana de miRNAs**

Los sistemas de predicción de interacciones potenciales mRNA-miRNA mediante algoritmos basados en uniones favorables, con energía libre mínima o bien mediante el estudio comparado de los niveles de mRNAs y miRNAs, requieren la posterior validación experimental de estas interacciones. Además, aunque la mayoría de los programas de predicción solo consideran las uniones miRNA-mRNA canónicas (Peterson y col., 2014), también se han descrito interacciones no canónicas (Harris 2013) para las que apenas existen algoritmos de búsqueda. Recientemente se ha descrito un método para aislar por inmunoprecipitación complejos que incluyen miRNAs unidos a su mRNA diana en asociación con la proteína del complejo RISC Ago2 (Scheel y col., 2016). Esta tecnología permite identificar por secuenciación masiva el miRNA y su mRNA de forma inequívoca y sería en el futuro la técnica de elección para confirmar experimentalmente las interacciones entre miRNAs y mRNAs dianas en la infección con el virus SARS-CoV. De esta forma se determinarían los miRNAs específicos potencialmente implicados en la patogénesis causada por la proteína E.

### **2.4. Regulación de la expresión génica por miRNAs en la infección viral**

La infección por SARS-CoV, y en general por virus, modifica el conjunto de miRNAs celulares y, en consecuencia, la regulación de la expresión génica. Los miRNAs afectados intervienen en la regulación de la respuesta defensiva (respuesta inmune innata) y en particular en la inflamación (O'Connell y col., 2012). Alternativamente, la

infección por SARS-CoV, podría interferir también en la acción reguladora de los miRNAs celulares, al actuar el propio RNA genómico viral como esponja que secuestrase miRNAs celulares, evitando que regulen a sus mRNAs diana celulares. Este efecto se ha descrito para otros virus RNA como el de la hepatitis C o pestivirus cuyos RNAs genómicos unen los miRNAs celulares miR-122 y miR-17, respectivamente, causando la desrepresión de sus dianas celulares para favorecer el crecimiento viral (Luna y col., 2015; Scheel y col., 2016).

### 3. svRNAs IDENTIFICADOS EN LA INFECCIÓN POR SARS-CoV

La secuenciación masiva de RNAs pequeños de pulmones infectados por SARS-CoV ha permitido identificar por primera vez en CoVs la existencia de ncRNAs de pequeño tamaño derivados del genoma viral. En otros virus RNA, como virus de la gripe (Perez y col., 2010), el enterovirus EV71 (Weng y col., 2014), el virus de la hepatitis A (Shi y col., 2014), HCV, Poliovirus, virus Dengue, VSV o WNV (Parameswaran y col., 2010), también se habían detectado ncRNAs pequeños aunque con biogénesis y funciones muy heterogéneas. La proporción de secuencias de RNA pequeño procedentes del genoma del SARS-CoV fue minoritaria (<0,1%) respecto al total de secuencias obtenidas de los pulmones infectados, de forma similar a lo observado en otros virus RNA (Parameswaran y col., 2010; Perez y col., 2010; Shi y col., 2014), lo que no excluye su relevancia funcional en la infección.

Entre las secuencias de RNAs pequeños de origen viral, o svRNAs, se identificaron tres que, en conjunto, representaban alrededor del 20% del total de svRNAs (Tabla XII). Dos de estos svRNAs, svRNA-nsp3.1 y nsp3.2, procedían de la región nsp3 de la replicasa viral, y el tercero, svRNA-N derivaban del gen N (Fig. 15).

Los svRNAs nsp3.1 y nsp3.2 procedieron de regiones muy próximas dentro del gen nsp3 (a 115 nt de distancia) y compartían los 11 primeros nt de su secuencia (Tabla XII). Esta misma secuencia está repetida tres veces en todo el genoma viral, concentradas en una región de 153 nt dentro de nsp3 (Fig. 15). Esta similitud entre los svRNAs nsp3.1 y nsp3.2 en secuencia y origen en el genoma podría estar relacionada con su biogénesis (Fig. 19 y 20) o con su función.

La producción de los tres svRNAs, nsp3.1, nsp3.2 y N, fue independiente del tipo celular y la especie hospedadora, así como de los distintos mutantes de SARS-CoV analizados (Fig. 15-17). Su abundancia fue proporcional a la cantidad de virus producido en la infección.

Las secuencias genómicas de las que derivan los tres svRNAs estaban conservadas en virus relacionados con SARS-CoV que infectan murciélagos, pero no en otros CoVs como MERS-CoV. La conservación de los svRNAs en la especie de



virus similares a SARS-CoV (*SARS-CoV-like*) y en distintas especies hospedadoras refuerza su relevancia en la infección.

En la infección *in vivo* únicamente el svRNA-nsp3.2 estuvo presente en el suero de los ratones, a diferencia de los svRNA-nsp3.1 y svRNA-N, a pesar de que su abundancia relativa en el pulmón era similar a la de svRNA-N (Fig. 16A). El svRNA-nsp3.2 podría ser transportado específica y activamente a la sangre como los miRNAs codificados por EBV, que son secretados en exosomas para ser transferidos a las células vecinas (Pegtel y col., 2010). O bien, el svRNA-nsp3.2 podría unirse a proteínas del suero a través de secuencias específicas del extremo 3', como se ha descrito para miRNAs circulantes (Villarroya-Beltri y col., 2013). Alternativamente, el svRNA-nsp3.2 podría ser más estable que los otros svRNAs en el suero.

Aunque es bien conocido que los virus DNA producen svRNAs implicados en la interacción con el hospedador, la existencia de svRNAs derivados del genoma de virus RNA ha sido objeto de controversia durante mucho tiempo. Se ha argumentado que su generación afectaría negativamente a los niveles de RNA genómico viral de los que provienen. Sin embargo, se han construido artificialmente virus RNA citoplasmáticos que producen desde su genoma miRNAs funcionales sin que este procesamiento afecte al crecimiento de los virus (Shapiro y col., 2010; Varble y col., 2010). Además, la secuencia de los svRNAs sería complementaria a moléculas de RNA de polaridad opuesta, que actúan como intermediarios en la replicación viral, con lo que podrían interferir en su función (Cullen, 2011). Sin embargo, la cantidad de moléculas de svRNAs observadas en virus RNA es en general significativamente menor que la de los RNAs virales genómico y subgenómico, por lo que su efecto directo sobre el RNA viral sería previsiblemente poco relevante. En el caso del virus HAV, se han descrito svRNAs generados en cantidades limitadas a partir de genes virales (Shi y col., 2014). En algunos virus como el DENV-2, se ha descrito un RNA no codificante, sfRNA, que es de 5-10 veces más abundante que el propio RNA genómico y no tiene un impacto negativo en la viabilidad viral (Bidet y col., 2014). En principio, los svRNAs podrían unirse a secuencias virales complementarias presentes en el RNA genómico o en RNAs intermediarios en la replicación. Sin embargo, su efecto en la viabilidad del virus será muy dependiente de las abundancias relativas de los svRNAs y de sus RNAs diana potenciales, tanto virales como celulares. En general, cuanto más abundantes sean los RNAs diana, mayor será su efecto de dilución sobre la actividad de los ncRNAs (Weill y col., 2015). Además, los svRNAs virales solo podrían unirse a RNAs complementarios accesibles en la célula y no a los que se encuentren protegidos en determinados compartimentos subcelulares. Por otra parte, algunos virus han

desarrollado estrategias de inhibición de la actividad RISC para proteger sus RNAs de la degradación (Parameswaran y col., 2010; Seo y col., 2013).

### **3.1. Biogénesis de los svRNAs**

Aunque existe un número limitado de ejemplos de svRNAs derivados de virus RNA, los mecanismos de formación descritos son muy diversos. En SARS-CoV, se ha determinado que la producción de los svRNAs requiere de la infección del SARS-CoV (Fig. 16-17) y no depende de las enzimas de procesamiento canónico de miRNAs celulares Drosha y Dicer (Fig. 20). Durante la infección, factores virales o celulares que se activan después de la infección viral serían los responsables de la biogénesis de los svRNAs de SARS-CoV. El virus SARS-CoV codifica en el gen de la replicasa la endorribonucleasa nsp15, que podría contribuir a la biogénesis de los svRNAs, dado que es capaz de procesar RNAs de cadena simple y doble mediante su actividad endorribonucleasa, aunque su función es aún desconocida (Ricagno y col., 2006).

En otros virus RNA (Shapiro y col., 2012) se ha descrito que Drosha se transloca desde el núcleo al citoplasma en la infección y contribuye al procesamiento de svRNAs a partir del genoma de virus RNA citoplasmáticos, sin necesidad de que el RNA viral esté en el núcleo. Además se han descrito vías no canónicas de producción de svRNAs en otros virus, como el virus de la gripe, en el que la RNA polimerasa viral es la responsable de la producción de svRNAs (Perez y col., 2010). En flavivirus, la exonucleasa celular XRN1 degrada el RNA genómico desde el extremo 5' del genoma hasta llegar a la región del extremo 3' que incluye el sfRNA, cuya estructura secundaria es resistente a la acción de XRN1 (Roby y col., 2014).

### **3.2. Efecto de los svRNAs sobre el crecimiento de SARS-CoV en cultivos celulares**

El estudio de la función de los svRNAs derivados de SARS-CoV requiere experimentos de pérdida de función utilizando como inhibidores oligonucleótidos complementarios específicos de svRNAs. Dado que se desconocen las dianas de los svRNAs, la inhibición se confirmó determinando los niveles de svRNAs. Se sabe que la inhibición mediada por interacciones RNA-RNA puede promover tanto la degradación del RNA complementario, como la represión de su actividad sin degradación. Por tanto, es posible que se haya inhibido la actividad del RNA pequeño sin detectar una reducción significativa en sus niveles (Davis y col., 2009; Elmen y col., 2008). Además, dado el pequeño tamaño de los RNAs analizados, se puede producir una interferencia entre las secuencias de los inhibidores y los oligonucleótidos utilizados en la detección (Torres y col., 2011). Por tanto, la cuantificación de los

niveles de un RNA pequeño en experimentos de inhibición no representa necesariamente una medida de la inhibición de su función.

El efecto de los svRNAs sobre el crecimiento del virus se estudió en cultivos celulares dado que otros efectos sobre la expresión de genes celulares podrían ser altamente dependientes del tejido infectado. En general, la inhibición de los svRNAs redujo el título viral de forma discreta, sugiriendo un efecto positivo de los mismos sobre el crecimiento viral. La mayor reducción se observó con el svRNA-N a las 72 hpi (Fig. 18). La inhibición de svRNAs no afectó los niveles de las proteínas virales nsp3 o N codificadas por los genes de los que derivaron los svRNAs, por lo que el efecto positivo sobre la producción viral podría estar mediado por la interferencia con procesos celulares antivirales, más que por la acción directa sobre la síntesis de RNA viral.

El efecto moderado de los svRNAs sobre la producción viral también se había observado en el virus de la gripe (Perez y col., 2010). Como la inhibición tuvo un efecto antiviral, los svRNAs no estarían participando en la defensa celular frente a la infección mediada por mecanismos de interferencia con RNA (RNAi), como sucede en plantas, artrópodos y nematodos, de acuerdo con la idea de que la respuesta antiviral en mamíferos depende fundamentalmente de proteínas como el IFN y otros mediadores de la respuesta inmune innata, y no de RNAs interferentes (tenOever, 2013).

### **3.3. Efecto de los svRNAs de SARS-CoV en el silenciamiento de mRNAs diana en cultivos celulares**

Por su tamaño, los svRNAs recordaban a los miRNAs celulares. Se estudió si de forma similar a los miRNAs, los svRNAs de SARS-CoV tenían la capacidad de silenciar la traducción de mRNAs diana, como se ha descrito en miRNAs virales derivados del virus HAV (Shi y col., 2014). En ensayos de silenciamiento de un gen marcador en ausencia de infección, los RNAs que mimetizaban a los tres svRNAs (nsp3.1, nsp3.2 y N) silenciaron la expresión de mRNAs dianas. La eficiencia de silenciamiento, así como la desrepresión por inhibidores específicos de los svRNAs dependía de la propia secuencia y, por tanto, de la estabilidad de las uniones RNA-RNA, así como del contexto molecular y de la abundancia de RNAs dianas potenciales, como se ha descrito para los miRNAs celulares (Ameres y Zamore, 2013; Bartel, 2009).

Sin embargo, solo el svRNA-N mantuvo la capacidad de silenciamiento en el contexto de la infección por SARS-CoV. Probablemente, durante la infección los svRNAs nsp3.1 y nsp3.2 podrían no tener acceso al mRNA diana, por encontrarse en

otra localización subcelular o alternatively, por estar interaccionando con otras moléculas. En este sentido, se ha identificado un miRNA celular, miR-877-3p, que podría unirse establemente a los svRNA-nsp3.1 y svRNA-nsp3.2 al tener 14-15 nt complementarios a ambos svRNAs, secuestrándolos e impidiendo que silencien sus mRNAs dianas. Los niveles de miR-877-3p aumentaron durante la infección del SARS-CoV en células DBT-mACE2 (Fig. 22C), así como en la infección por MERS-CoV (comunicación personal de Paul McCray Universidad de Iowa, USA, 2017). La función de este miRNA se ha relacionado con la regulación de la fibrosis pulmonar (Wang y col., 2016), así como con procesos inflamatorios (Liang y col., 2016), aunque su relevancia en la infección por SARS-CoV está por determinar.

La capacidad del svRNA-N de silenciar la traducción de mRNAs diana, incluso en el contexto de la infección, en el que los niveles de svRNA-N generados a partir del genoma viral podrían ser inferiores a los del RNA mimético tranfectado, sugiere que este svRNA podría tener *in vivo* la función de reprimir la expresión de mRNAs celulares. Esta función requeriría que la ruta celular de RNAi no estuviera inhibida por la infección del SARS-CoV. En las células infectadas se confirmó que la actividad de silenciamiento de un mRNA diana por un miRNA celular era tan eficiente como en células no infectadas, a diferencia de lo descrito en otros virus, que interfieren con la ruta RNAi celular (Seo y col., 2013).

### 3.4. Función del svRNA-N en la infección de ratones

Para estudiar la relevancia de los svRNAs derivados de SARS-CoV en la infección, es necesario trabajar en un modelo de infección *in vivo* que reproduzca la interacción virus-hospedador. Por ello, se inhibió el svRNA-N en ratones infectados y se estudió su efecto en patogénesis, utilizando un modelo animal que reproduce fielmente lo observado en humanos.

La inhibición de este svRNA *in vivo* implicaba conseguir que los oligonucleótidos antisentido administrados accedieran a las células pulmonares infectadas en las que se estaba produciendo el svRNA. Aunque los antecedentes conocidos de la administración de inhibidores de RNA utilizaban la vía intraperitoneal (Elmen y col., 2008) o intratraqueal (Liu y col., 2010), se decidió administrar el inhibidor intranasalmente, de forma similar a como se inocula el virus SARS-CoV. Esta vía era mínimamente invasiva y dirigía el inhibidor específicamente al tejido pulmonar susceptible a la infección. Se comprobó que el inhibidor redujo eficientemente los niveles del svRNA-N de forma sostenida a lo largo de la infección, lo que validó el procedimiento de administración. Además, no se observaron efectos secundarios asociados a la administración del inhibidor (Fig. 25-26).

La inhibición del svRNA-N en los pulmones de los ratones redujo moderadamente los niveles de gRNA (+) a 2 ddi sin afectar a los títulos virales (Fig. 25), sugiriendo que el efecto del svRNA-N en la replicación viral en pulmón no era significativo.

Sin embargo, fue interesante observar que el inhibidor anti-svRNA-N disminuyó la patología de la infección pulmonar por SARS-CoV. Macroscópicamente, los pulmones de los ratones tratados con el inhibidor anti-svRNA-N presentaron menos daño hemorrágico. El análisis histopatológico confirmó que la inhibición del svRNA-N medió la reducción de los infiltrados de células inflamatorias y la acumulación de material proteináceo en los alveolos pulmonares durante la progresión del edema. Además, moduló la reducción de los niveles de citoquinas pro-inflamatorias CCL2, IL-6 y CXCL-10, sobre-expresadas en la infección por SARS-CoV. Por el contrario, otras moléculas mediadoras de la respuesta a infecciones virales, como ISG15 y MX1 aumentaron al inhibir el svRNA-N. En infecciones con el virus Chikungunya de ratones en los que se había eliminado el factor ISG15 se promovió la expresión de citoquinas pro-inflamatorias (Werneke y col., 2011), sugiriendo que ISG15 tiene una función inmunomoduladora más que un efecto antiviral directo. En conjunto, nuestros resultados confirmaron que la patología pulmonar causada por SARS-CoV se debió a la desregulación de la respuesta inflamatoria y a la excesiva producción de citoquinas pro-inflamatorias con independencia de los títulos virales, siempre que se haya alcanzado un umbral mínimo de replicación viral que estimula excesivamente la respuesta inmune innata (Channappanavar y col., 2016; Jimenez-Guardeño y col., 2014; Nicholls y col., 2003; Nieto-Torres y col., 2014).

Los resultados mostraron que el svRNA-N era uno de los factores virales que contribuyeron a la patogénesis inflamatoria del pulmón causada por la infección del SARS-CoV. Sin embargo, el tratamiento con el inhibidor del svRNA-N no fue suficiente para aumentar la supervivencia de los ratones (Fig. 25), posiblemente por la contribución dominante de otros factores de virulencia virales. Por eso, la administración de inhibidores del svRNA-N como antivirales debería utilizarse en combinación con otras terapias para conseguir protección completa. La alta especificidad de estos inhibidores, que solo reconocen moléculas con la secuencia complementaria como el svRNA-N, es una ventaja para evitar efectos inespecíficos no deseados sobre el hospedador. De hecho, inhibidores del miRNA-122, esencial para el crecimiento del virus HCV, se han ensayado como antivirales en humanos y se ha demostrado que su administración reduce eficazmente y de forma segura los niveles de RNA virales (Janssen y col., 2013).

### 3.5. Predicción de dianas de los svRNAs

El mecanismo de acción del svRNA-N por el que incrementa la expresión de citoquinas pro-inflamatorias o inhibe la de mediadores antivirales es aún desconocido (Fig. 28). El svRNA-N podría funcionar de forma análoga a un miRNA celular, reprimiendo la expresión de factores inhibidores de la inflamación mediante interacciones RNA-RNA. Esta capacidad de silenciar mRNAs diana se ha demostrado para svRNA-N en cultivos celulares y se ha descrito en otros ncRNAs virales (Shi y col., 2014; Tycowski y col., 2015). Alternativamente, el svRNA-N podría ejercer su función uniéndose a proteínas, como se ha descrito en ncRNAs derivados de flavivirus (Bidet y col., 2014; Manokaran y col., 2015; Roby y col., 2014) o del virus de la gripe (Perez y col., 2012).

El algoritmo de búsqueda de RNAs diana (*RNAhybrid*) predijo una secuencia complementaria al svRNA-N en el mRNA de ISG15, cuya expresión aumentó al inhibir el svRNA-N en los ratones. Esta proteína podría regular negativamente las citoquinas pro-inflamatorias, como se ha descrito (Werneke y col., 2011). Las citoquinas pro-inflamatorias no incluyen aparentemente secuencias diana del svRNA-N, pero su expresión podría verse alterada indirectamente por reguladores de la expresión de citoquinas que forman parte de una red reguladora más compleja y sean dianas del svRNA-N.

Conocer el mecanismo de acción preciso de los svRNAs en la infección implicaría identificar sus mRNAs diana. Actualmente la búsqueda de mRNAs diana es también el principal desafío en el campo de estudio de los miRNAs (Riffo-Campos y col., 2016). Los programas habituales de predicción de dianas pueden aplicarse a miRNAs celulares que estén anotados (Riffo-Campos y col., 2016) y, por tanto, no son útiles para nuevos svRNAs. Además, estos algoritmos utilizan los criterios conocidos en el silenciamiento de miRNAs de células de mamífero, que no tienen por qué ser los mismos que los de svRNAs. Estos criterios corresponden a la interacción canónica de los miRNAs con el 3' UTR de sus mRNAs diana a través de la secuencia semilla del miRNA (nt 2-8). Sin embargo, existen evidencias recientes de que otras interacciones miRNA-mRNA no canónicas son posibles (Bartel, 2009).

La búsqueda de dianas con el programa *RNAhybrid*, que utiliza como único criterio la estabilidad de la interacción RNA-RNA medida como la variación de energía libre, llevó a la predicción de un número de dianas potenciales excesivamente elevado (más de 27.000), lo que complica los estudios de validación posteriores. Lamentablemente, en este momento se desconocen los criterios que habría que aplicar para reducir el número de mRNAs diana candidatos.

Estrictamente, la búsqueda de dianas de svRNAs debería realizarse dentro de una subpoblación de mRNAs que corresponda a aquellas proteínas que están menos expresadas en la infección. Sin embargo, el conocimiento del proteoma celular en presencia o ausencia de infección es un objetivo complejo.

Es posible que la estrategia más directa para identificar mRNAs diana sea la técnica de inmunoprecipitación de complejos de silenciamiento que contienen la proteína Ago2 junto con pequeños ncRNAs unidos establemente a sus mRNAs diana, de forma que su secuencia se determine por secuenciación masiva (Scheel y col., 2016).

La mejora de los programas de predicción de dianas de miRNAs y nuevos conocimientos de RNAs no codificantes de distintos sistemas virales contribuirán en el futuro al conocimiento de las funciones de los ncRNAs virales en la interacción virus-hospedador.





## **CONCLUSIONES**

---



1. Se ha determinado que la infección de ratones con el virus virulento SARS-CoV o con el virus atenuado SARS-CoV- $\Delta$ E sin la proteína E induce en el pulmón la expresión diferencial de miRNAs celulares cuyas dianas potenciales están relacionadas con la regulación de la inflamación mediante citoquinas.
2. Se han identificado por primera vez en la infección por coronavirus RNAs pequeños (18-22nt) derivados del genoma de SARS-CoV (svRNAs) tanto en pulmones de ratones como en líneas celulares de origen murino o humano. Su generación es independiente de la especie o el tipo celular infectados y su abundancia depende de los niveles de producción viral.
3. Se han caracterizado tres svRNAs derivados de la secuencia nsp3 de la replicasa viral (svRNA-nsp3.1 y svRNA-nsp3.2) y del gen de la nucleoproteína (svRNA-N), que se expresan abundantemente en la infección por SARS-CoV y representan el 18% de todas las secuencias virales pequeñas identificadas en los pulmones de ratón.
4. Se ha determinado que la biogénesis de los svRNAs en la infección es independiente de las enzimas con actividad RNasa III de la ruta canónica celular de producción de miRNAs (Drosha y Dicer).
5. Se ha determinado en ensayos de inhibición que los svRNAs nsp3.1, nsp3.2 y N regulan de forma positiva, aunque moderada, el crecimiento de SARS-CoV en cultivos celulares, siendo el svRNA-N el que tiene un efecto más significativo. La inhibición de los svRNAs nsp3.1, nsp3.2 y N no afecta la expresión de las proteínas viales nsp3 y N.
6. Se ha demostrado que, en ausencia de infección, secuencias miméticas de los svRNAs nsp3.1, nsp3.2 y N silencian significativamente la expresión de mRNAs diana que incluyen secuencias complementarias en el extremo 3' UTR. Sin embargo, durante la infección por SARS-CoV sólo el svRNA-N conserva la capacidad de silenciamiento, sugiriendo un acceso limitado de svRNAs nsp3.1 y nsp3.2 a sus mRNAs dianas.
7. Se ha demostrado que la inhibición del svRNA-N en la infección *in vivo* con oligonucleótidos antisentido (antagomirs) administrados intranasalmente a los

ratones antes de la infección reduce más del 95% los niveles pulmonares del svRNA-N sin producir efectos secundarios visibles.

8. Se ha demostrado que la inhibición específica del svRNA-N reduce significativamente la patología pulmonar causada por SARS-CoV, disminuyendo las lesiones hemorrágicas, el edema y los infiltrados de células inflamatorias, sin afectar al crecimiento viral. La inhibición reduce además la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias IL-6, CCL2 y CXCL10, asociadas a la patología respiratoria de SARS-CoV, mientras que aumenta la expresión de los moduladores antivirales ISG15 and MX1.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---



- Abend, J.R., Ramalingam, D., Kieffer-Kwon, P., Uldrick, T.S., Yarchoan, R., Ziegelbauer, J.M., 2012.** Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus microRNAs target IRAK1 and MYD88, two components of the toll-like receptor/interleukin-1R signaling cascade, to reduce inflammatory-cytokine expression. *J. Virol.* 86, 11663-11674.
- Aguado, L.C., Schmid, S., Sachs, D., Shim, J.V., Lim, J.K., tenOever, B.R., 2015.** microRNA function is limited to cytokine control in the acute response to virus infection. *Cell Host Microbe* 18, 714-722.
- Ala, U., Karreth, F.A., Bosia, C., Pagnani, A., Taulli, R., Leopold, V., Tay, Y., Provero, P., Zecchina, R., Pandolfi, P.P., 2013.** Integrated transcriptional and competitive endogenous RNA networks are cross-regulated in permissive molecular environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 7154-7159.
- Aliyari, R., Ding, S.W., 2009.** RNA-based viral immunity initiated by the Dicer family of host immune receptors. *Immunol. Rev.* 227, 176-188.
- Almazan, F., DeDiego, M.L., Galan, C., Escors, D., Alvarez, E., Ortego, J., Sola, I., Zuñiga, S., Alonso, S., Moreno, J.L., Nogales, A., Capiscol, C., Enjuanes, L., 2006.** Construction of a severe acute respiratory syndrome coronavirus infectious cDNA clone and a replicon to study coronavirus RNA synthesis. *J. Virol.* 80, 10900-10906.
- Almazan, F., DeDiego, M.L., Sola, I., Zuñiga, S., Nieto-Torres, J.L., Marquez-Jurado, S., Andres, G., Enjuanes, L., 2013.** Engineering a replication-competent, propagation-defective Middle East respiratory syndrome coronavirus as a vaccine candidate. *MBio* 4, e00650-00613.
- Almazan, F., Galan, C., Enjuanes, L., 2004.** The nucleoprotein is required for efficient coronavirus genome replication. *J. Virol.* 78, 12683-12688.
- Ameres, S.L., Zamore, P.D., 2013.** Diversifying microRNA sequence and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 475-488.
- Anders, S., Pyl, P.T., Huber, W., 2015.** HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 31, 166-169.
- Annan, A., Baldwin, H.J., Corman, V.M., Klose, S.M., Owusu, M., Nkrumah, E.E., Badu, E.K., Anti, P., Agbenyega, O., Meyer, B., Oppong, S., Sarkodie, Y.A., Kalko, E.K., Lina, P.H., Godlevska, E.V., Reusken, C., Seebens, A., Gloza-Rausch, F., Vallo, P., Tschapka, M., Drosten, C., Drexler, J.F., 2013.** Human betacoronavirus 2c EMC/2012-related viruses in bats, Ghana and Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 456-459.
- Asirvatham, A.J., Magner, W.J., Tomasi, T.B., 2009.** miRNA regulation of cytokine genes. *Cytokine* 45, 58-69.

- Assiri, A., McGeer, A., Perl, T.M., Price, C.S., Al Rabeeah, A.A., Cummings, D.A., Alabdullatif, Z.N., Assad, M., Almulhim, A., Makhdoom, H., Madani, H., Alhakeem, R., Al-Tawfiq, J.A., Cotten, M., Watson, S.J., Kellam, P., Zumla, A.I., Memish, Z.A., 2013.** Hospital outbreak of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *N. Engl. J. Med.*, doi:10.1056/NEJMoa1306742.
- Atkinson, S.R., Marguerat, S., Bahler, J., 2012.** Exploring long non-coding RNAs through sequencing. *Semin. Cell Dev. Biol.* 23, 200-205.
- Baek, D., Villen, J., Shin, C., Camargo, F.D., Gygi, S.P., Bartel, D.P., 2008.** The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 455, 64-71.
- Bao, Y., Guo, Y., Li, Z., Fang, W., Yang, Y., Li, X., Li, Z., Xiong, B., Chen, Z., Wang, J., Kang, K., Gou, D., Yang, W., 2014.** MicroRNA profiling in Muc2 knockout mice of colitis-associated cancer model reveals epigenetic alterations during chronic colitis malignant transformation. *PLoS One* 9, e99132.
- Bartel, D.P., 2004.** MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297.
- Bartel, D.P., 2009.** MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215-233.
- Bellare, P., Ganem, D., 2009.** Regulation of KSHV lytic switch protein expression by a virus-encoded microRNA: an evolutionary adaptation that fine-tunes lytic reactivation. *Cell Host Microbe* 6, 570-575.
- Belotti, E., Polanowska, J., Daulat, A.M., Audebert, S., Thome, V., Lissitzky, J.C., Lembo, F., Blibek, K., Omi, S., Lenfant, N., Gangar, A., Montcouquiol, M., Santoni, M.J., Sebbagh, M., Aurrand-Lions, M., Angers, S., Kodjabachian, L., Reboul, J., Borg, J.P., 2013.** The human PDZome: a gateway to PSD95-Disc large-zonula occludens (PDZ)-mediated functions. *Mol. Cell Proteomics* 12, 2587-2603.
- Belouzard, S., Millet, J.K., Licitra, B.N., Whittaker, G.R., 2012.** Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses* 4, 1011-1033.
- Benitez, A.A., Spanko, L.A., Bouhaddou, M., Sachs, D., tenOever, B.R., 2015.** Engineered mammalian RNAi can elicit antiviral protection that negates the requirement for the interferon response. *Cell Rep.* 13, 1456-1466.
- Benjamini, Y., Hochberg, Y., 1995.** Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. Roy. Stat. Soc. B* 57, 289-300.
- Bertoli, G., Cava, C., Castiglioni, I., 2015.** MicroRNAs: New biomarkers for diagnosis, prognosis, therapy prediction and therapeutic tools for breast cancer. *Theranostics* 5, 1122-1143.



- Bidet, K., Dadlani, D., Garcia-Blanco, M.A., 2014.** G3BP1, G3BP2 and CAPRIN1 are required for translation of interferon stimulated mRNAs and are targeted by a dengue virus non-coding RNA. *PLoS Pathog.* 10, e1004242.
- Boss, I.W., Renne, R., 2010.** Viral miRNAs: tools for immune evasion. *Curr. Opin. Microbiol.* 13, 540-545.
- Brian, D.A., Baric, R.S., 2005.** Coronavirus genome structure and replication. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 287, 1-30.
- Bueno, M.J., Gomez de Cedron, M., Gomez-Lopez, G., Perez de Castro, I., Di Lisio, L., Montes-Moreno, S., Martinez, N., Guerrero, M., Sanchez-Martinez, R., Santos, J., Pisano, D.G., Piris, M.A., Fernandez-Piqueras, J., Malumbres, M., 2011.** Combinatorial effects of microRNAs to suppress the Myc oncogenic pathway. *Blood* 117, 6255-6266.
- Buggele, W.A., Horvath, C.M., 2013.** MicroRNA profiling of Sendai virus-infected A549 cells identifies miR-203 as an interferon-inducible regulator of IFIT1/ISG56. *J. Virol.* 87, 9260-9270.
- Burke, J.M., Kuny, C.V., Kincaid, R.P., Sullivan, C.S., 2015.** Identification, validation, and characterization of noncanonical miRNAs. *Methods* 91, 57-68.
- Bushati, N., Cohen, S.M., 2007.** microRNA functions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23, 175-205.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009.** The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55, 611-622.
- Carstens, E.B., 2010.** Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2009). *Arch. Virol.* 155, 133-146.
- Cazalla, D., Yario, T., Steitz, J.A., 2010.** Down-regulation of a host microRNA by a Herpesvirus saimiri noncoding RNA. *Science* 328, 1563-1566.
- Cech, T.R., Steitz, J.A., 2014.** The noncoding RNA revolution-trashing old rules to forge new ones. *Cell* 157, 77-94.
- Channappanavar, R., Fehr, A.R., Vijay, R., Mack, M., Zhao, J., Meyerholz, D.K., Perlman, S., 2016.** Dysregulated type I interferon and inflammatory monocyte-macrophage responses cause lethal pneumonia in SARS-CoV-infected mice. *Cell Host Microbe.* 19, 181-193.
- Chen, X., Liang, H., Zhang, J., Zen, K., Zhang, C.Y., 2012.** Horizontal transfer of microRNAs: molecular mechanisms and clinical applications. *Protein Cell* 3, 28-37.

- Chi, S.W., Zang, J.B., Mele, A., Darnell, R.B., 2009.** Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps. *Nature* 460, 479-486.
- Chinese-Consortium, S.M.E., 2004.** Molecular evolution of the SARS coronavirus during the course of the SARS epidemic in China. *Science* 303, 1666-1669.
- Chu, D.K., Peiris, J.S., Chen, H., Guan, Y., Poon, L.L., 2008.** Genomic characterizations of bat coronaviruses (1A, 1B and HKU8) and evidence for co-infections in *Miniopterus* bats. *J. Gen. Virol.* 89, 1282-1287.
- Coleman, C.M., Frieman, M.B., 2014.** Coronaviruses: important emerging human pathogens. *J. Virol.* 88, 5209-5212.
- Coronnello, C., Hartmaier, R., Arora, A., Huleihel, L., Pandit, K.V., Bais, A.S., Butterworth, M., Kaminski, N., Stormo, G.D., Oesterreich, S., Benos, P.V., 2012.** Novel modeling of combinatorial miRNA targeting identifies SNP with potential role in bone density. *PLoS Comput. Biol.* 8, e1002830.
- Cox, J.E., Sullivan, C.S., 2014.** Balance and stealth: The role of noncoding RNAs in the regulation of virus gene expression. *Annu. Rev. Virol.* 1, 89-109.
- Cullen, B.R., 2011.** Viruses and microRNAs: RISCy interactions with serious consequences. *Genes Dev.* 25, 1881-1894.
- Dai, L., Chen, K., Youngren, B., Kulina, J., Yang, A., Guo, Z., Li, J., Yu, P., Gu, S., 2016.** Cytoplasmic Drosha activity generated by alternative splicing. *Nucleic Acids Res.* 44, 10454-10466.
- Datta, S., Datta, S., Kim, S., Chakraborty, S., Gill, R.S., 2010.** Statistical Analyses of Next Generation Sequence Data: A Partial Overview. *J. Proteomics Bioinform.* 3, 183-190.
- Davis, S., Propp, S., Freier, S.M., Jones, L.E., Serra, M.J., Kinberger, G., Bhat, B., Swayze, E.E., Bennett, C.F., Esau, C., 2009.** Potent inhibition of microRNA in vivo without degradation. *Nucleic Acids Res.* 37, 70-77.
- Day, C.W., Baric, R., Cai, S.X., Frieman, M., Kumaki, Y., Morrey, J.D., Smeeth, D.F., Barnard, D.L., 2009.** A new mouse-adapted strain of SARS-CoV as a lethal model for evaluating antiviral agents in vitro and in vivo. *Virology* 395, 210-222.
- de Groot, R.J., Baker, S.C., Baric, R., Enjuanes, L., Gorbalenya, A.E., Holmes, K.V., Perlman, S., Poon, L., Rottier, P.J.M., Talbot, P.J., Woo, P.C.Y., Ziebuhr, J., 2012.** Family Coronaviridae, in: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (Eds.), *Virus Taxonomy*. Elsevier, Amsterdam, pp. 774-796.
- de Groot, R.J., Baker, S.C., Baric, R.S., Brown, C.S., Drosten, C., Enjuanes, L., Fouchier, R.A., Galiano, M., Gorbalenya, A.E., Memish, Z.A., Perlman, S., Poon, L.L., Snijder, E.J., Stephens, G.M., Woo, P.C., Zaki, A.M., Zambon,**

- M., Ziebuhr, J., 2013.** Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the Coronavirus Study Group. *J. Virol.* 87, 7790-7792.
- DeDiego, M.L., Alvarez, E., Almazan, F., Rojas, M.T., Lamirande, E., Roberts, A., Shieh, W.J., Zaki, S.R., Subbarao, K., Enjuanes, L., 2007.** A severe acute respiratory syndrome coronavirus that lacks the E gene is attenuated in vitro and in vivo. *J. Virol.* 81, 1701-1713.
- DeDiego, M.L., Nieto-Torres, J.L., Jimenez-Guardeño, J.M., Regla-Nava, J.A., Alvarez, E., Oliveros, J.C., Zhao, J., Fett, C., Perlman, S., Enjuanes, L., 2011.** Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein regulates cell stress response and apoptosis. *PLoS Pathog.* 7, e1002315.
- DeDiego, M.L., Nieto-Torres, J.L., Regla-Nava, J.A., Jimenez-Guardeño, J.M., Fernandez-Delgado, R., Fett, C., Castaño-Rodriguez, C., Perlman, S., Enjuanes, L., 2014.** Inhibition of NF-kappaB mediated inflammation in severe acute respiratory syndrome coronavirus-infected mice increases survival. *J. Virol.* 88, 913-924.
- DeDiego, M.L., Pewe, L., Alvarez, E., Rojas, M.T., Perlman, S., Enjuanes, L., 2008.** Pathogenicity of severe acute respiratory coronavirus deletion mutants in hACE-2 transgenic mice. *Virology* 376, 379-389.
- Delmas, B., Gelfi, J., Laude, H., 1986.** Antigenic structure of transmissible gastroenteritis virus. II. Domains in the peplomer glycoprotein. *J. Gen. Virol.* 67, 1405-1418.
- Delmas, B., Laude, H., 1990.** Assembly of coronavirus spike protein into trimers and its role in epitope expression. *J. Virol.* 64, 5367-5375.
- Donnelly, C.A., Ghani, A.C., Leung, G.M., Hedley, A.J., Fraser, C., Riley, S., Abu-Raddad, L.J., Ho, L.-M., Thach, T.-Q., Chau, P., 2003.** Epidemiological determinants of spread of causal agent of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *Lancet* 361, 1761-1766.
- Drexler, J.F., Gloza-Rausch, F., Glende, J., Corman, V.M., Muth, D., Goettsche, M., Seebens, A., Niedrig, M., Pfefferle, S., Yordanov, S., Zhelyazkov, L., Hermanns, U., Vallo, P., Lukashev, A., Muller, M.A., Deng, H., Herrler, G., Drosten, C., 2010.** Genomic characterization of severe acute respiratory syndrome-related coronavirus in European bats and classification of coronaviruses based on partial RNA-dependent RNA polymerase gene sequences. *J. Virol.* 84, 11336-11349.
- Drosten, C., Gunther, S., Preiser, W., van der Werf, S., Brodt, H.R., Becker, S., Rabenau, H., Panning, M., Kolesnikova, L., Fouchier, R.A., Berger, A., Burguiere, A.M., Cinatl, J., Eickmann, M., Escriou, N., Grywna, K.,**

- Kramme, S., Manuguerra, J.C., Muller, S., Rickerts, V., Sturmer, M., Vieth, S., Klenk, H.D., Osterhaus, A.D., Schmitz, H., Doerr, H.W., 2003.** Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* 348, 1967-1976.
- Dufresne, M., Seva, C., Fourmy, D., 2006.** Cholecystokinin and gastrin receptors. *Physiol. Rev.* 86, 805-847.
- Eleouet, J.F., Slee, E.A., Saurini, F., Castagné, N., Poncet, D., Garrido, C., Solary, E., Martin, S.J., 2000.** The viral nucleocapsid protein of transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) is cleaved by caspase-6 and -7 during TGEV-induced apoptosis. *J. Virol.* 74, 3975-3983.
- Elmen, J., Lindow, M., Schutz, S., Lawrence, M., Petri, A., Obad, S., Lindholm, M., Hedtjarn, M., Hansen, H.F., Berger, U., Gullans, S., Kearney, P., Sarnow, P., Straarup, E.M., Kauppinen, S., 2008.** LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature* 452, 896-899.
- Enjuanes, L., Almazan, F., Sola, I., Zuñiga, S., 2006.** Biochemical aspects of coronavirus replication and virus-host interaction. *Annu. Rev. Microbiol.* 60, 211-230.
- Enjuanes, L., Correa, I., Jimenez, G., Melgosa, M.P., Bullido, M.J., 1987.** Critical epitopes in transmissible gastroenteritis virus neutralization. *Adv. Exp. Med. Biol.* 218, 351-363.
- Enjuanes, L., DeDiego, M.L., Alvarez, E., Capiscol, C., Baric, R., 2008a.** Vaccines for severe acute respiratory syndrome virus and other coronaviruses, in: Perlman, S., Gallagher, T.M., Snijder, E.J. (Eds.), *Nidoviruses*. ASM Press., Washington, pp. 379-408.
- Enjuanes, L., Gorbalenya, A.E., de Groot, R.J., Cowley, J.A., Ziebuhr, J., Snijder, E.J., 2008b.** The Nidovirales, in: Mahy, B.W.J., Van Regenmortel, M., Walker, P., Majumder-Russell, D. (Eds.), *Encyclopedia of Virology*, Third Edition. Elsevier Ltd., Oxford, pp. 419-430.
- Enjuanes, L., Sola, I., Zuñiga, S., Moreno, J.L., 2007.** Coronavirus RNA synthesis: Transcription, in: Thiel, V. (Ed.), *Coronaviruses: Molecular and cellular biology*. Caister Academic Press, Norfolk, pp. 81-107.
- Enjuanes, L., Zuñiga, S., Castaño-Rodríguez, C., Gutierrez-Alvarez, J., Canton, J., Sola, I., 2016.** Molecular basis of coronavirus virulence and vaccine development. *Adv. Virus Res.* 96, 245-286.
- Fabian, M.R., Sonenberg, N., 2012.** The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 586-593.

- Falcon, A., Vazquez-Moron, S., Casas, I., Aznar, C., Ruiz, G., Pozo, F., Perez-Brena, P., Juste, J., Ibanez, C., Garin, I., Aihartza, J., Echevarria, J.E., 2011.** Detection of alpha and betacoronaviruses in multiple Iberian bat species. *Arch. Virol.* 156, 1883-1890.
- Fett, C., DeDiego, M.L., Regla-Nava, J.A., Enjuanes, L., Perlman, S., 2013.** Complete protection against severe acute respiratory syndrome coronavirus-mediated lethal respiratory disease in aged mice by immunization with a mouse-adapted virus lacking E protein. *J. Virol.* 87, 6551-6559.
- Fouchier, R.A., Kuiken, T., Schutten, M., van Amerongen, G., van Doornum, G.J., van den Hoogen, B.G., Peiris, M., Lim, W., Stohr, K., Osterhaus, A.D., 2003.** Aetiology: Koch's postulates fulfilled for SARS virus. *Nature* 423, 240.
- Franks, T.J., Chong, P.Y., Chui, P., Galvin, J.R., Lourens, R.M., Reid, A.H., Selbs, E., McEvoy, C.P., Hayden, C.D., Fukuoka, J., Taubenberger, J.K., Travis, W.D., 2003.** Lung pathology of severe acute respiratory syndrome (SARS): a study of 8 autopsy cases from Singapore. *Hum. Pathol.* 34, 743-748.
- Frieman, M., Baric, R., 2008.** Mechanisms of severe acute respiratory syndrome pathogenesis and innate immunomodulation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72, 672-685, Table of Contents.
- Frieman, M., Heise, M., Baric, R., 2008.** SARS coronavirus and innate immunity. *Virus Res.* 133, 101-112.
- Gallagher, T.M., Buchmeier, M.J., 2001.** Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis. *Virology* 279, 371-374.
- Garbino, J., Crespo, S., Aubert, J.D., Rochat, T., Ninet, B., Deffernez, C., Wunderli, W., Pache, J.C., Soccac, P.M., Kaiser, L., 2006.** A prospective hospital-based study of the clinical impact of non-severe acute respiratory syndrome (Non-SARS)-related human coronavirus infection. *Clin. Infect. Dis.* 43, 1009-1015.
- Ge, X.Y., Li, J.L., Yang, X.L., Chmura, A.A., Zhu, G., Epstein, J.H., Mazet, J.K., Hu, B., Zhang, W., Peng, C., Zhang, Y.J., Luo, C.M., Tan, B., Wang, N., Zhu, Y., Crameri, G., Zhang, S.Y., Wang, L.F., Daszak, P., Shi, Z.L., 2013.** Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature* 503, 535-538.
- Geisler, S., Coller, J., 2013.** RNA in unexpected places: long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 699-712.
- Gorbalenya, A.E., Enjuanes, L., Ziebuhr, J., Snijder, E.J., 2006.** Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome. *Virus Res.* 117, 17-37.

- Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V., Donchenko, A.P., Blinov, V.M., 1989.** Coronavirus genome: prediction of putative functional domains in the non-structural polyprotein by comparative amino acid sequence analysis. *Nucleic Acids Res.* 17, 4847-4861.
- Graham, R.L., Donaldson, E.F., Baric, R.S., 2013.** A decade after SARS: strategies for controlling emerging coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 836-848.
- Granger, D.N., Senchenkova, E., 2010.** Angiogenesis, Inflammation and the Microcirculation. Morgan & Claypool Life Sciences, San Rafael (CA).
- Greenough, T.C., Carville, A., Coderre, J., Somasundaran, M., Sullivan, J.L., Luzuriaga, K., Mansfield, K., 2005.** Pneumonitis and multi-organ system disease in common marmosets (*Callithrix jacchus*) infected with the severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus. *Am. J. Pathol.* 167, 455-463.
- Grundhoff, A., Sullivan, C.S., 2011.** Virus-encoded microRNAs. *Virology* 411, 325-343.
- Haagmans, B.L., Kuiken, T., Martina, B.E., Fouchier, R.A., Rimmelzwaan, G.F., van Amerongen, G., van Riel, D., de Jong, T., Itamura, S., Chan, K.H., Tashiro, M., Osterhaus, A.D., 2004.** Pegylated interferon-alpha protects type 1 pneumocytes against SARS coronavirus infection in macaques. *Nat. Med.* 10, 290-293.
- Hansen, T.B., Kjems, J., Bramsen, J.B., 2011.** Enhancing miRNA annotation confidence in miRBase by continuous cross dataset analysis. *RNA Biol.* 8, 378-383.
- Harris, J.F., Micheva-Viteva, S., Li, N., Hong-Geller, E., 2013.** Small RNA-mediated regulation of host-pathogen interactions. *Virulence* 4, 785-795.
- Hausser, J., Zavolan, M., 2014.** Identification and consequences of miRNA-target interactions--beyond repression of gene expression. *Nat. Rev. Genet.* 15, 599-612.
- Ho, B.C., Yang, P.C., Yu, S.L., 2016.** MicroRNA and pathogenesis of enterovirus infection. *Viruses* 8, doi:10.3390/v8010011.
- Hou, J., Wang, P., Lin, L., Liu, X., Ma, F., An, H., Wang, Z., Cao, X., 2009.** MicroRNA-146a feedback inhibits RIG-I-dependent Type I IFN production in macrophages by targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2. *J. Immunol.* 183, 2150-2158.
- Hsiao, C.H., Chang, M.F., Hsueh, P.R., Su, I.J., 2005.** Immunohistochemical study of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus in tissue sections of patients. *J. Formos. Med. Assoc.* 104, 150-156.

- Huang, C., Narayanan, K., Ito, N., Peters, C.J., Makino, S., 2006.** Severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a protein is released in membranous structures from 3a protein-expressing cells and infected cells. *J. Virol.* 80, 210-217.
- Huang, C., Peters, C.J., Makino, S., 2007.** Severe acute respiratory syndrome coronavirus accessory protein 6 is a virion-associated protein and is released from 6 protein-expressing cells. *J. Virol.* 81, 5423-5426.
- Huntley, R.P., Sitnikov, D., Orlic-Milacic, M., Balakrishnan, R., D'Eustachio, P., Gillespie, M.E., Howe, D., Kalea, A.Z., Maegdefessel, L., Osumi-Sutherland, D., Petri, V., Smith, J.R., Van Auken, K., Wood, V., Zampetaki, A., Mayr, M., Lovering, R.C., 2016.** Guidelines for the functional annotation of microRNAs using the Gene Ontology. *RNA* 22, 667-676.
- Huynh, J., Li, S., Yount, B., Smith, A., Sturges, L., Olsen, J.C., Nagel, J., Johnson, J.B., Agnihothram, S., Gates, J.E., Frieman, M.B., Baric, R.S., Donaldson, E.F., 2012.** Evidence supporting a zoonotic origin of human coronavirus strain NL63. *J. Virol.* 86, 12816-12825.
- Igaz, P., Salvi, R., Rey, J.P., Glauser, M., Pralong, F.P., Gaillard, R.C., 2006.** Effects of cytokines on gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene expression in primary hypothalamic neurons and in GnRH neurons immortalized conditionally. *Endocrinology* 147, 1037-1043.
- Inui, M., Martello, G., Piccolo, S., 2010.** MicroRNA control of signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 252-263.
- Jacobs, L., Van der Zeijst, B.A.M., Horzinek, M., 1986.** Characterization and translation of transmissible gastroenteritis virus mRNAs. *J. Virol.* 57, 1010-1015.
- Janssen, H.L., Reesink, H.W., Lawitz, E.J., Zeuzem, S., Rodriguez-Torres, M., Patel, K., van der Meer, A.J., Patick, A.K., Chen, A., Zhou, Y., Persson, R., King, B.D., Kauppinen, S., Levin, A.A., Hodges, M.R., 2013.** Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N. Engl. J. Med.* 368, 1685-1694.
- Jimenez, G., Correa, I., Melgosa, M.P., Bullido, M.J., Enjuanes, L., 1986.** Critical epitopes in transmissible gastroenteritis virus neutralization. *J. Virol.* 60, 131-139.
- Jimenez-Guardeño, J.M., Nieto-Torres, J.L., DeDiego, M.L., Regla-Nava, J.A., Fernandez-Delgado, R., Castaño-Rodriguez, C., Enjuanes, L., 2014.** The PDZ-binding motif of severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein is a determinant of viral pathogenesis. *PLoS Pathog.* 10, e1004320.

- Kai, Z.S., Pasquinelli, A.E., 2010.** MicroRNA assassins: factors that regulate the disappearance of miRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 5-10.
- Kan, B., Wang, M., Jing, H., Xu, H., Jiang, X., Yan, M., Liang, W., Zheng, H., Wan, K., Liu, Q., Cui, B., Xu, Y., Zhang, E., Wang, H., Ye, J., Li, G., Li, M., Cui, Z., Qi, X., Chen, K., Du, L., Gao, K., Zhao, Y.T., Zou, X.Z., Feng, Y.J., Gao, Y.F., Hai, R., Yu, D., Guan, Y., Xu, J., 2005.** Molecular evolution analysis and geographic investigation of severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in palm civets at an animal market and on farms. *J. Virol.* 79, 11892-11900.
- Kass, A., Hollan, I., Fagerland, M.W., Gulseth, H.C., Torjesen, P.A., Forre, O.T., 2015.** Rapid anti-inflammatory effects of gonadotropin-releasing hormone antagonism in rheumatoid arthritis patients with high gonadotropin levels in the AGRA trial. *PLoS One* 10, e0139439.
- Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., Salzberg, S.L., 2013.** TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.* 14, R36.
- Kim, Y.K., Kim, V.N., 2007.** Processing of intronic microRNAs. *EMBO J.* 26, 775-783.
- Kindler, E., Thiel, V., Weber, F., 2016.** Interaction of SARS and MERS coronaviruses with the antiviral interferon response. *Adv. Virus Res.* 96, 219-243.
- Kitagawa, N., Goto, M., Kurozumi, K., Maruo, S., Fukayama, M., Naoe, T., Yasukawa, M., Hino, K., Suzuki, T., Todo, S., Takada, K., 2000.** Epstein-Barr virus-encoded poly(A)(-) RNA supports Burkitt's lymphoma growth through interleukin-10 induction. *EMBO J.* 19, 6742-6750.
- Knoops, K., Kikkert, M., Worm, S.H., Zevenhoven-Dobbe, J.C., van der Meer, Y., Koster, A.J., Mommaas, A.M., Snijder, E.J., 2008.** SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. *PLoS Biol.* 6, e226.
- Komano, J., Maruo, S., Kurozumi, K., Oda, T., Takada, K., 1999.** Oncogenic role of Epstein-Barr virus-encoded RNAs in Burkitt's lymphoma cell line Akata. *J. Virol.* 73, 9827-9831.
- Kozomara, A., Griffiths-Jones, S., 2011.** miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 39, D152-D127.
- Kozomara, A., Griffiths-Jones, S., 2014.** miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 42, D68-D73.
- Lai, M.M.C., Cavanagh, D., 1997.** The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 48, 1-100.



- Lamirande, E.W., DeDiego, M.L., Roberts, A., Jackson, J.P., Alvarez, E., Sheahan, T., Shieh, W.J., Zaki, S.R., Baric, R., Enjuanes, L., Subbarao, K., 2008.** A live attenuated SARS coronavirus is immunogenic and efficacious in golden Syrian hamsters. *J. Virol.* 82, 7721-7724.
- Lau, S.K., Woo, P.C., Li, K.S., Huang, Y., Tsoi, H.W., Wong, B.H., Wong, S.S., Leung, S.Y., Chan, K.H., Yuen, K.Y., 2005.** Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 14040-14045.
- Laude, H., Masters, P.S., 1995.** The coronavirus nucleocapsid protein, in: Siddell, S.G. (Ed.), *The coronaviridae*. Plenum press, New York, pp. 141-158.
- Lee, E.J., Baek, M., Gusev, Y., Brackett, D.J., Nuovo, G.J., Schmittgen, T.D., 2008.** Systematic evaluation of microRNA processing patterns in tissues, cell lines, and tumors. *RNA* 14, 35-42.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V., 1993.** The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854.
- Lei, X., Bai, Z., Ye, F., Xie, J., Kim, C.G., Huang, Y., Gao, S.J., 2010.** Regulation of NF-kappaB inhibitor IkappaBalpha and viral replication by a KSHV microRNA. *Nat. Cell Biol.* 12, 193-199.
- Li, H., Durbin, R., 2009.** Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25, 1754-1760.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., Genome Project Data Processing, S., 2009.** The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25, 2078-2079.
- Li, W., Moore, M.J., Vasilieva, N., Sui, J., Wong, S.K., Berne, M.A., Somasundaran, M., Sullivan, J.L., Luzuriaga, K., Greenough, T.C., Choe, H., Farzan, M., 2003.** Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for de SARS coronavirus. *Nature* 426, 450-454.
- Li, W., Shi, Z., Yu, M., Ren, W., Smith, C., Epstein, J.H., Wang, H., Crameri, G., Hu, Z., Zhang, H., Zhang, J., McEachern, J., Field, H., Daszak, P., Eaton, B.T., Zhang, S., Wang, L.F., 2005.** Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science* 310, 676-679.
- Liang, Y., Zhao, G., Tang, L., Zhang, J., Li, T., Liu, Z., 2016.** MiR-100-3p and miR-877-3p regulate overproduction of IL-8 and IL-1beta in mesangial cells activated by secretory IgA from IgA nephropathy patients. *Exp. Cell Res.* 347, 312-321.

- Liao, Y., Smyth, G.K., Shi, W., 2014.** featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30, 923-930.
- Liu, G., Friggeri, A., Yang, Y., Milosevic, J., Ding, Q., Thannickal, V.J., Kaminski, N., Abraham, E., 2010.** miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis. *J. Exp. Med.* 207, 1589-1597.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J., 2000.** Processing of rRNA and tRNA, in: Freeman, W.H. (Ed.), *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman and Company, New York.
- Loutfy, M.R., Blatt, L.M., Siminovitch, K.A., Ward, S., Wolff, B., Lho, H., Pham, D.H., Deif, H., LaMere, E.A., Chang, M., Kain, K.C., Farcas, G.A., Ferguson, P., Latchford, M., Levy, G., Dennis, J.W., Lai, E.K., Fish, E.N., 2003.** Interferon alfacon-1 plus corticosteroids in severe acute respiratory syndrome: a preliminary study. *J. Am. Med. Assoc.* 290, 3222-3228.
- Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014.** Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15, 550.
- Lu, X., Pan, J., Tao, J., Guo, D., 2011.** SARS-CoV nucleocapsid protein antagonizes IFN-beta response by targeting initial step of IFN-beta induction pathway, and its C-terminal region is critical for the antagonism. *Virus Genes* 42, 37-45.
- Ludwig, N., Leidinger, P., Becker, K., Backes, C., Fehlmann, T., Pallasch, C., Rheinheimer, S., Meder, B., Stahler, C., Meese, E., Keller, A., 2016.** Distribution of miRNA expression across human tissues. *Nucleic Acids Res.* 44, 3865-3877.
- Luna, J.M., Scheel, T.K., Danino, T., Shaw, K.S., Mele, A., Fak, J.J., Nishiuchi, E., Takacs, C.N., Catanese, M.T., de Jong, Y.P., Jacobson, I.M., Rice, C.M., Darnell, R.B., 2015.** Hepatitis C virus RNA functionally sequesters miR-122. *Cell* 160, 1099-1110.
- Maeda, J., Repass, J.F., Maeda, A., Makino, S., 2001.** Membrane topology of coronavirus E protein. *Virology* 281, 163-169.
- Mah, S.M., Buske, C., Humphries, R.K., Kuchenbauer, F., 2010.** miRNA\*: a passenger stranded in RNA-induced silencing complex? *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 20, 141-148.

- Mallick, B., Ghosh, Z., Chakrabarti, J., 2009.** MicroRNome analysis unravels the molecular basis of SARS infection in bronchoalveolar stem cells. *PLoS One* 4, e7837.
- Manokaran, G., Finol, E., Wang, C., Gunaratne, J., Bahl, J., Ong, E.Z., Tan, H.C., Sessions, O.M., Ward, A.M., Gubler, D.J., Harris, E., Garcia-Blanco, M.A., Ooi, E.E., 2015.** Dengue subgenomic RNA binds TRIM25 to inhibit interferon expression for epidemiological fitness. *Science* 350, 217-221.
- Masters, P.S., 2006.** The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 66, 193-292.
- Mateos-Gomez, P.A., Morales, L., Zuñiga, S., Enjuanes, L., Sola, I., 2013.** Long-distance RNA-RNA interactions in the coronavirus genome form high-order structures promoting discontinuous RNA synthesis during transcription. *J. Virol.* 87, 177-186.
- Mateos-Gomez, P.A., Zuñiga, S., Palacio, L., Enjuanes, L., Sola, I., 2011.** Gene N proximal and distal RNA motifs regulate coronavirus nucleocapsid mRNA transcription. *J. Virol.* 85, 8968-8980.
- Mathews, M.B., Shenk, T., 1991.** Adenovirus virus-associated RNA and translation control. *J. Virol.* 65, 5657-5662.
- Matthay, M.A., Zemans, R.L., 2011.** The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment. *Annu. Rev. Pathol.* 6, 147-163.
- McAuliffe, J., Vogel, L., Roberts, A., Fahle, G., Fischer, S., Shieh, W.J., Butler, E., Zaki, S., St Claire, M., Murphy, B., Subbarao, K., 2004.** Replication of SARS coronavirus administered into the respiratory tract of African Green, rhesus and cynomolgus monkeys. *Virology* 330, 8-15.
- McClurkin, A.W., Norman, J.O., 1966.** Studies on transmissible gastroenteritis of swine. II. Selected characteristics of a cytopathogenic virus common to five isolates from transmissible gastroenteritis. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 30, 190-198.
- McIntosh, K., Kapikian, A.Z., Hardison, K.A., Hartley, J.W., Chanock, R.M., 1969.** Antigenic relationships among the coronaviruses of man and between human and animal coronaviruses. *J. Immunol.* 102, 1109-1118.
- Meguro, H., Bryant, J.D., Torrence, A.E., Wright, P.F., 1979.** Canine kidney cell line for isolation of respiratory viruses. *J. Clin. Microbiol.* 9, 175-179.
- Mercer, T.R., Dinger, M.E., Mattick, J.S., 2009.** Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat. Rev. Genet.* 10, 155-159.

- Mleczko, A.M., Bakowska-Zywicka, K., 2016.** When small RNAs become smaller: emerging functions of snoRNAs and their derivatives. *Acta Biochim. Pol.* 63, 601-607.
- Morales, L., Oliveros, J.C., Fernandez-Delgado, R., tenOever, B.R., Enjuanes, L., Sola, I., 2017.** SARS-CoV-encoded small RNAs contribute to infection-associated lung pathology. *Cell Host Microbe* 21, 344-355.
- Muller, M.A., Paweska, J.T., Leman, P.A., Drosten, C., Grywna, K., Kemp, A., Braack, L., Sonnenberg, K., Niedrig, M., Swanepoel, R., 2007.** Coronavirus antibodies in African bat species. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 1367-1370.
- Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Fukushi, S., Harashima, A., Sato, Y., Saijo, M., Taguchi, F., Morikawa, S., Sata, T., 2008.** Mouse-passaged severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus leads to lethal pulmonary edema and diffuse alveolar damage in adult but not young mice. *Am. J. Pathol.* 172, 1625-1637.
- Narayanan, K., Huang, C., Makino, S., 2008.** SARS coronavirus accessory proteins. *Virus Res.* 133, 113-121.
- Narayanan, K., Makino, S., 2001.** Cooperation of an RNA packaging signal and a viral envelope protein in coronavirus RNA Packaging. *J. Virol.* 75, 9059-9067.
- Netland, J., DeDiego, M.L., Zhao, J., Fett, C., Alvarez, E., Nieto-Torres, J.L., Enjuanes, L., Perlman, S., 2010.** Immunization with an attenuated severe acute respiratory syndrome coronavirus deleted in E protein protects against lethal respiratory disease. *Virology* 399, 120-128.
- Nguyen, V.P., Hogue, B.G., 1997.** Protein interactions during coronavirus assembly. *J. Virol.* 71, 9278-9284.
- Nicholls, J.M., Butany, J., Poon, L.L., Chan, K.H., Beh, S.L., Poutanen, S., Peiris, J.S., Wong, M., 2006.** Time course and cellular localization of SARS-CoV nucleoprotein and RNA in lungs from fatal cases of SARS. *PLoS Med.* 3, e27.
- Nicholls, J.M., Poon, L.L., Lee, K.C., Ng, W.F., Lai, S.T., Leung, C.Y., Chu, C.M., Hui, P.K., Mak, K.L., Lim, W., Yan, K.W., Chan, K.H., Tsang, N.C., Guan, Y., Yuen, K.Y., Peiris, J.S., 2003.** Lung pathology of fatal severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 361, 1773-1778.
- Nieto-Torres, J.L., Dediego, M.L., Alvarez, E., Jimenez-Guardeno, J.M., Regla-Nava, J.A., Llorente, M., Kremer, L., Shuo, S., Enjuanes, L., 2011.** Subcellular location and topology of severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein. *Virology* 415, 69-82.
- Nieto-Torres, J.L., Dediego, M.L., Verdia-Baguena, C., Jimenez-Guardeño, J.M., Regla-Nava, J.A., Fernandez-Delgado, R., Castaño-Rodriguez, C., Alcaraz,**

- A., Torres, J., Aguilera, V.M., Enjuanes, L., 2014.** Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein ion channel activity promotes virus fitness and pathogenesis. *PLoS Pathog.* 10, e1004077.
- Nieto-Torres, J.L., Verdia-Baguena, C., Jimenez-Guardeno, J.M., Regla-Nava, J.A., Castano-Rodriguez, C., Fernandez-Delgado, R., Torres, J., Aguilera, V.M., Enjuanes, L., 2015.** Severe acute respiratory syndrome coronavirus E protein transports calcium ions and activates the NLRP3 inflammasome. *Virology* 485, 330-339.
- Noymer, A.,** Alpha, Significance Level of Test. *Encyclopedia of Survey Research Methods.* SAGE Publications, Inc. SAGE Publications, Inc., Thousand Oaks, CA.
- Noymer, A., 2008.** Alpha, Significance Level of Test. *Encyclopedia of Survey Research Methods.* SAGE Publications, Inc. SAGE Publications, Inc., Thousand Oaks, CA.
- Nyayanit, D., Gadgil, C.J., 2015.** Mathematical modeling of combinatorial regulation suggests that apparent positive regulation of targets by miRNA could be an artifact resulting from competition for mRNA. *RNA* 21, 307-319.
- O'Connell, R.M., Rao, D.S., Baltimore, D., 2012.** microRNA regulation of inflammatory responses. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 295-312.
- O'Neill, L.A., Sheedy, F.J., McCoy, C.E., 2011.** MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 163-175.
- Oliva, G., Sahr, T., Rolando, M., Knoth, M., Buchrieser, C., 2017.** A unique cis-encoded small noncoding RNA is regulating *Legionella pneumophila* Hfq expression in a life cycle-dependent manner. *MBio* 8, e02182-02116.
- Ortego, J., Ceriani, J.E., Patino, C., Plana, J., Enjuanes, L., 2007.** Absence of E protein arrests transmissible gastroenteritis coronavirus maturation in the secretory pathway. *Virology* 368, 296-308.
- Ortego, J., Escors, D., Laude, H., Enjuanes, L., 2002.** Generation of a replication-competent, propagation-deficient virus vector based on the transmissible gastroenteritis coronavirus genome. *J. Virol.* 76, 11518-11529.
- Page, C., Goicochea, L., Matthews, K., Zhang, Y., Klover, P., Holtzman, M.J., Hennighausen, L., Frieman, M., 2012.** Induction of alternatively activated macrophages enhances pathogenesis during severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *J. Virol.* 86, 13334-13349.
- Page, K.W., Britton, P., Bourns, M.E.G., 1990.** Sequence analysis of the leader RNA of two porcine coronaviruses: transmissible gastroenteritis coronavirus and porcine respiratory coronavirus. *Virus Genes* 4, 289-301.

- Pall, G.S., Hamilton, A.J., 2008.** Improved northern blot method for enhanced detection of small RNA. *Nat. Protoc.* 3, 1077-1084.
- Parameswaran, P., Sklan, E., Wilkins, C., Burgon, T., Samuel, M.A., Lu, R., Ansel, K.M., Heissmeyer, V., Einav, S., Jackson, W., Doukas, T., Paranjape, S., Polacek, C., dos Santos, F.B., Jalili, R., Babrzadeh, F., Gharizadeh, B., Grimm, D., Kay, M., Koike, S., Sarnow, P., Ronaghi, M., Ding, S.W., Harris, E., Chow, M., Diamond, M.S., Kirkegaard, K., Glenn, J.S., Fire, A.Z., 2010.** Six RNA viruses and forty-one hosts: viral small RNAs and modulation of small RNA repertoires in vertebrate and invertebrate systems. *PLoS Pathog.* 6, e1000764.
- Parkin, J., Cohen, B., 2001.** An overview of the immune system. *Lancet* 357, 1777-1789.
- Pegtel, D.M., Cosmopoulos, K., Thorley-Lawson, D.A., van Eijndhoven, M.A., Hopmans, E.S., Lindenberg, J.L., de Gruijl, T.D., Wurdinger, T., Middeldorp, J.M., 2010.** Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 6328-6333.
- Peiris, J.S., Chu, C.M., Cheng, V.C., Chan, K.S., Hung, I.F., Poon, L.L., Law, K.I., Tang, B.S., Hon, T.Y., Chan, C.S., Chan, K.H., Ng, J.S., Zheng, B.J., Ng, W.L., Lai, R.W., Guan, Y., Yuen, K.Y., 2003.** Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. *Lancet* 361, 1767-1772.
- Peng, X., Gralinski, L., Ferris, M.T., Frieman, M.B., Thomas, M.J., Proll, S., Korth, M.J., Tisoncik, J.R., Heise, M., Luo, S., Schroth, G.P., Tumpey, T.M., Li, C., Kawaoka, Y., Baric, R.S., Katze, M.G., 2011.** Integrative deep sequencing of the mouse lung transcriptome reveals differential expression of diverse classes of small RNAs in response to respiratory virus infection. *MBio* 2, e00198-00111.
- Penzes, Z., Gonzalez, J.M., Calvo, E., Izeta, A., Smerdou, C., Mendez, A., Sanchez, C.M., Sola, I., Almazan, F., Enjuanes, L., 2001.** Complete genome sequence of transmissible gastroenteritis coronavirus PUR46-MAD clone and evolution of the purdue virus cluster. *Virus Genes* 23, 105-118.
- Perez, J.T., Varble, A., Sachidanandam, R., Zlatev, I., Manoharan, M., Garcia-Sastre, A., tenOever, B.R., 2010.** Influenza A virus-generated small RNAs regulate the switch from transcription to replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 11525-11530.
- Perez, J.T., Zlatev, I., Aggarwal, S., Subramanian, S., Sachidanandam, R., Kim, B., Manoharan, M., tenOever, B.R., 2012.** A small-RNA enhancer of viral polymerase activity. *J. Virol.* 86, 13475-13485.

- Perlman, S., Netland, J., 2009.** Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 439-450.
- Peter, M.E., 2010.** Targeting of mRNAs by multiple miRNAs: the next step. *Oncogene* 29, 2161-2164.
- Peterson, S.M., Thompson, J.A., Ufkin, M.L., Sathyanarayana, P., Liaw, L., Congdon, C.B., 2014.** Common features of microRNA target prediction tools. *Front. Genet.* 5, 23.
- Pink, R.C., Samuel, P., Massa, D., Caley, D.P., Brooks, S.A., Carter, D.R., 2015.** The passenger strand, miR-21-3p, plays a role in mediating cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Gynecol. Oncol.* 137, 143-151.
- Ponting, C.P., Oliver, P.L., Reik, W., 2009.** Evolution and functions of long noncoding RNAs. *Cell* 136, 629-641.
- Quan, P.L., Firth, C., Street, C., Henriquez, J.A., Petrosov, A., Tashmukhamedova, A., Hutchison, S.K., Egholm, M., Osinubi, M.O., Niezgoda, M., Ogunkoya, A.B., Briese, T., Rupprecht, C.E., Lipkin, W.I., 2010.** Identification of a severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in a leaf-nosed bat in Nigeria. *MBio* 1, e00208-00210.
- Regla-Nava, J.A., Jimenez-Guardeño, J.M., Nieto-Torres, J.L., Gallagher, T.M., Enjuanes, L., DeDiego, M.L., 2013.** The replication of a mouse adapted SARS-CoV in a mouse cell line stably expressing the murine SARS-CoV receptor mACE2 efficiently induces the expression of proinflammatory cytokines. *J. Virol. Methods* 193, 639-646.
- Regla-Nava, J.A., Nieto-Torres, J.L., Jimenez-Guardeno, J.M., Fernandez-Delgado, R., Fett, C., Castano-Rodriguez, C., Perlman, S., Enjuanes, L., DeDiego, M.L., 2015.** Severe acute respiratory syndrome coronaviruses with mutations in the E protein are attenuated and promising vaccine candidates. *J. Virol.* 89, 3870-3887.
- Rehmsmeier, M., Steffen, P., Hochsmann, M., Giegerich, R., 2004.** Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *RNA* 10, 1507-1517.
- Ricagno, S., Egloff, M.P., Ulferts, R., Coutard, B., Nurizzo, D., Campanacci, V., Cambillau, C., Ziebuhr, J., Canard, B., 2006.** Crystal structure and mechanistic determinants of SARS coronavirus nonstructural protein 15 define an endoribonuclease family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 11892-11897.
- Riffo-Campos, A.L., Riquelme, I., Brebi-Mieville, P., 2016.** Tools for Sequence-Based miRNA Target Prediction: What to Choose? *Int. J. Mol. Sci.* 17, 1987.
- Riley, K.J., Rabinowitz, G.S., Steitz, J.A., 2010.** Comprehensive analysis of Rhesus lymphocryptovirus microRNA expression. *J. Virol.* 84, 5148-5157.

- Roberts, A., Deming, D., Paddock, C.D., Cheng, A., Yount, B., Vogel, L., Herman, B.D., Sheahan, T., Heise, M., Genrich, G.L., Zaki, S.R., Baric, R., Subbarao, K., 2007.** A mouse-adapted SARS-coronavirus causes disease and mortality in BALB/c mice. *PLoS Pathog.* 3, 23-37.
- Robinson, J.T., Thorvaldsdottir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E.S., Getz, G., Mesirov, J.P., 2011.** Integrative genomics viewer. *Nat. Biotechnol.* 29, 24-26.
- Robinson, M.D., McCarthy, D.J., Smyth, G.K., 2010.** edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26, 139-140.
- Roby, J.A., Pijlman, G.P., Wilusz, J., Khromykh, A.A., 2014.** Noncoding subgenomic flavivirus RNA: multiple functions in West Nile virus pathogenesis and modulation of host responses. *Viruses* 6, 404-427.
- Rota, P.A., Oberste, M.S., Monroe, S.S., Nix, W.A., Campganoli, R., Icenogle, J.P., Peñaranda, S., Bankamp, B., Maher, K., Chen, M.-H., Tong, S., Tamin, A., Lowe, L., Frace, M., DeRisi, J.L., Chen, Q., Wang, D., Erdman, D.d., Peret, T.C.T., Burns, C., Ksiazek, T.G., Rollin, P.E., Sanchez, A., Liffick, S., Holloway, B., Limor, J., McCaustland, K., Olsen-Rassmussen, M., Fouchier, R., Gunther, S., Osterhaus, A.D.M.E., Drosten, C., Pallansch, M.A., Anderson, L.J., Bellini, W.J., 2003.** Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* 300, 1394-1399.
- Ruch, T.R., Machamer, C.E., 2012.** The Coronavirus E Protein: Assembly and Beyond. *Viruses* 4, 363-382.
- Salanueva, I.J., Carrascosa, J.L., Risco, C., 1999.** Structural maturation of the transmissible gastroenteritis coronavirus. *J. Virol.* 73, 7952-7964.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001.** *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanchez, C.M., Jiménez, G., Laviada, M.D., Correa, I., Suñe, C., Bullido, M.J., Gebauer, F., Smerdou, C., Callebaut, P., Escribano, J.M., Enjuanes, L., 1990.** Antigenic homology among coronaviruses related to transmissible gastroenteritis virus. *Virology* 174, 410-417.
- Sarkar, A., Volff, J.N., Vaury, C., 2017.** piRNAs and their diverse roles: a transposable element-driven tactic for gene regulation? *FASEB J.* 31, 436-446.
- Sawicki, S.G., Sawicki, D.L., 1990.** Coronavirus transcription: subgenomic mouse hepatitis virus replicative intermediates function in RNA synthesis. *J. Virol.* 64, 1050-1056.



- Sawicki, S.G., Sawicki, D.L., Siddell, S.G., 2007.** A contemporary view of coronavirus transcription. *J. Virol.* 81, 20-29.
- Schaecher, S.R., Mackenzie, J.M., Pekosz, A., 2007.** The ORF7b protein of SARS-CoV is expressed in virus-infected cells and incorporated into SARS-CoV particles. *J. Virol.* 81, 718-731.
- Scheel, T.K., Luna, J.M., Liniger, M., Nishiuchi, E., Rozen-Gagnon, K., Shlomai, A., Auray, G., Gerber, M., Fak, J., Keller, I., Bruggmann, R., Darnell, R.B., Ruggli, N., Rice, C.M., 2016.** A broad RNA virus survey reveals both miRNA dependence and functional sequestration. *Cell Host Microbe* 19, 409-423.
- Schelle, B., Karl, N., Ludewig, B., Siddell, S.G., Thiel, V., 2005.** Selective replication of coronavirus genomes that express nucleocapsid protein. *J. Virol.* 79, 6620-6630.
- Schickel, R., Boyerinas, B., Park, S.M., Peter, M.E., 2008.** MicroRNAs: key players in the immune system, differentiation, tumorigenesis and cell death. *Oncogene* 27, 5959-5974.
- Schnettler, E., Sterken, M.G., Leung, J.Y., Metz, S.W., Geertsema, C., Goldbach, R.W., Vlak, J.M., Kohl, A., Khromykh, A.A., Pijlman, G.P., 2012.** Noncoding flavivirus RNA displays RNA interference suppressor activity in insect and Mammalian cells. *J. Virol.* 86, 13486-13500.
- Seo, G.J., Kincaid, R.P., Phanaksri, T., Burke, J.M., Pare, J.M., Cox, J.E., Hsiang, T.Y., Krug, R.M., Sullivan, C.S., 2013.** Reciprocal inhibition between intracellular antiviral signaling and the RNAi machinery in mammalian cells. *Cell Host Microbe* 14, 435-445.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., Ideker, T., 2003.** Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 13, 2498-2504.
- Shapiro, J.S., Langlois, R.A., Pham, A.M., Tenover, B.R., 2012.** Evidence for a cytoplasmic microprocessor of pri-miRNAs. *RNA* 18, 1338-1346.
- Shapiro, J.S., Varble, A., Pham, A.M., Tenover, B.R., 2010.** Noncanonical cytoplasmic processing of viral microRNAs. *RNA* 16, 2068-2074.
- Shen, S., Lin, P.S., Chao, Y.C., Zhang, A., Yang, X., Lim, S.G., Hong, W., Tan, Y.J., 2005.** The severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a is a novel structural protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330, 286-292.
- Shi, J., Sun, J., Wang, B., Wu, M., Zhang, J., Duan, Z., Wang, H., Hu, N., Hu, Y., 2014.** Novel microRNA-like viral small regulatory RNAs arising during human hepatitis A virus infection. *FASEB J.* 28, 4381-4393.

- Shieh, W.J., Hsiao, C.H., Paddock, C.D., Guarner, J., Goldsmith, C.S., Tatti, K., Packard, M., Mueller, L., Wu, M.Z., Rollin, P., Su, I.J., Zaki, S.R., 2005.** Immunohistochemical, in situ hybridization, and ultrastructural localization of SARS-associated coronavirus in lung of a fatal case of severe acute respiratory syndrome in Taiwan. *Hum. Pathol.* 36, 303-309.
- Sibley, C.R., Seow, Y., Saayman, S., Dijkstra, K.K., El Andaloussi, S., Weinberg, M.S., Wood, M.J., 2012.** The biogenesis and characterization of mammalian microRNAs of mirtron origin. *Nucleic Acids Res.* 40, 438-448.
- Sola, I., Almazán, F., Zúñiga, S., Enjuanes, L., 2015.** Continuous and discontinuous RNA synthesis in coronaviruses. *Annu. Rev. Virol.* 2, 265-288.
- Sola, I., Mateos-Gomez, P.A., Almazan, F., Zúñiga, S., Enjuanes, L., 2011.** RNA-RNA and RNA-protein interactions in coronavirus replication and transcription. *RNA Biol.* 8, 237-248.
- Sola, I., Moreno, J.L., Zúñiga, S., Alonso, S., Enjuanes, L., 2005.** Role of nucleotides immediately flanking the transcription-regulating sequence core in coronavirus subgenomic mRNA synthesis. *J. Virol.* 79, 2506-2516.
- Song, H.D., Tu, C.C., Zhang, G.W., Wang, S.Y., Zheng, K., Lei, L.C., Chen, Q.X., Gao, Y.W., Zhou, H.Q., Xiang, H., Zheng, H.J., Chern, S.W., Cheng, F., Pan, C.M., Xuan, H., Chen, S.J., Luo, H.M., Zhou, D.H., Liu, Y.F., He, J.F., Qin, P.Z., Li, L.H., Ren, Y.Q., Liang, W.J., Yu, Y.D., Anderson, L., Wang, M., Xu, R.H., Wu, X.W., Zheng, H.Y., Chen, J.D., Liang, G., Gao, Y., Liao, M., Fang, L., Jiang, L.Y., Li, H., Chen, F., Di, B., He, L.J., Lin, J.Y., Tong, S., Kong, X., Du, L., Hao, P., Tang, H., Bernini, A., Yu, X.J., Spiga, O., Guo, Z.M., Pan, H.Y., He, W.Z., Manuguerra, J.C., Fontanet, A., Danchin, A., Niccolai, N., Li, Y.X., Wu, C.I., Zhao, G.P., 2005.** Cross-host evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus in palm civet and human. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 2430-2435.
- Stadler, K., Massignani, V., Eickmann, M., Becker, S., Abrignani, S., Klenk, H.D., Rappuoli, R., 2003.** SARS--beginning to understand a new virus. *Nat. Rev. Microbiol.* 1, 209-218.
- Stertz, S., Reichelt, M., Spiegel, M., Kuri, T., Martinez-Sobrido, L., Garcia-Sastre, A., Weber, F., Kochs, G., 2007.** The intracellular sites of early replication and budding of SARS-coronavirus. *Virology* 361, 304-315.
- Sturman, L.S., Holmes, K.V., Behnke, J., 1980.** Isolation of coronavirus envelope glycoproteins and interaction with the viral nucleocapsid. *J. Virol.* 33, 449-462.
- Sullivan, C.S., Ganem, D., 2005.** A virus-encoded inhibitor that blocks RNA interference in mammalian cells. *J. Virol.* 79, 7371-7379.

- Surya, W., Li, Y., Verdia-Baguena, C., Aguilera, V.M., Torres, J., 2015.** MERS coronavirus envelope protein has a single transmembrane domain that forms pentameric ion channels. *Virus Res.* 201, 61-66.
- Taft, R.J., Pang, K.C., Mercer, T.R., Dinger, M., Mattick, J.S., 2010.** Non-coding RNAs: regulators of disease. *J. Pathol.* 220, 126-139.
- Taft, R.J., Pheasant, M., Mattick, J.S., 2007.** The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity. *Bioessays* 29, 288-299.
- Tang, N.L., 2009.** Immunogenetic studies in SARS: developing a clinical prognostic profile for severe diseases. *Hong Kong Med. J.* 15 Suppl 8, 8-10.
- Tav, C., Tempel, S., Poligny, L., Tahi, F., 2016.** miRNAFold: a web server for fast miRNA precursor prediction in genomes. *Nucleic Acids Res.* 44, W181-W184.
- tenOever, B.R., 2013.** RNA viruses and the host microRNA machinery. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 169-180.
- tenOever, B.R., 2016.** The Evolution of Antiviral Defense Systems. *Cell Host Microbe* 19, 142-149.
- Teoh, K.T., Siu, Y.L., Chan, W.L., Schluter, M.A., Liu, C.J., Peiris, J.S., Bruzzone, R., Margolis, B., Nal, B., 2010.** The SARS coronavirus E protein interacts with PALS1 and alters tight junction formation and epithelial morphogenesis. *Mol. Biol. Cell.* 21, 3838-3852.
- Thiel, V., Ivanov, K.A., Putics, A., Hertzog, T., Schelle, B., Bayer, S., Wessbrich, B., Snijder, E.J., Rabenau, H., Doerr, H.W., Gorbalenya, A.E., Ziebuhr, J., 2003.** Mechanisms and enzymes involved in SARS coronavirus genome expression. *J. Gen. Virol.* 84, 2305-2315.
- Thiel, V., Weber, F., 2008.** Interferon and cytokine responses to SARS-coronavirus infection. *Cytokine Growth Factor Rev.* 19, 121-132.
- Tisoncik, J.R., Korth, M.J., Simmons, C.P., Farrar, J., Martin, T.R., Katze, M.G., 2012.** Into the eye of the cytokine storm. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76, 16-32.
- Tooze, J., Tooze, S., Warren, G., 1984.** Replication of coronavirus MHV-A59 in sac-cells: determination of the first site of budding of progeny virions. *Eur. J. Cell. Biol.* 33, 281-294.
- Tooze, J., Tooze, S.A., Fuller, S.D., 1987.** Sorting of progeny coronavirus from condensed secretory proteins at the exit from the trans-golgi network of atT20 cells. *J. Cell Biol.* 105, 1215-1226.
- Torres, A.G., Fabani, M.M., Vigorito, E., Gait, M.J., 2011.** MicroRNA fate upon targeting with anti-miRNA oligonucleotides as revealed by an improved Northern-blot-based method for miRNA detection. *RNA* 17, 933-943.

- Trobaugh, D.W., Klimstra, W.B., 2017.** MicroRNA regulation of RNA virus replication and pathogenesis. *Trends Mol. Med.* 23, 80-93.
- Tseng, C.T., Sbrana, E., Iwata-Yoshikawa, N., Newman, P.C., Garron, T., Atmar, R.L., Peters, C.J., Couch, R.B., 2012.** Immunization with SARS coronavirus vaccines leads to pulmonary immunopathology on challenge with the SARS virus. *PLoS One* 7, e35421.
- Tycowski, K.T., Guo, Y.E., Lee, N., Moss, W.N., Vallery, T.K., Xie, M., Steitz, J.A., 2015.** Viral noncoding RNAs: more surprises. *Genes Dev.* 29, 567-584.
- van der Hoek, L., Pyrc, K., Jebbink, M.F., Vermeulen-Oost, W., Berkhout, R.J., Wolthers, K.C., Wertheim-van Dillen, P.M., Kaandorp, J., Spaargaren, J., Berkhout, B., 2004.** Identification of a new human coronavirus. *Nat. Med.* 10, 368-373.
- Varble, A., Chua, M.A., Perez, J.T., Manicassamy, B., Garcia-Sastre, A., tenOever, B.R., 2010.** Engineered RNA viral synthesis of microRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 11519-11524.
- Verdia-Baguena, C., Nieto-Torres, J.L., Alcaraz, A., Dediego, M.L., Torres, J., Aguilera, V.M., Enjuanes, L., 2012.** Coronavirus E protein forms ion channels with functionally and structurally-involved membrane lipids. *Virology* 432, 485-494.
- Vidigal, J.A., Ventura, A., 2015.** The biological functions of miRNAs: lessons from in vivo studies. *Trends Cell Biol.* 25, 137-147.
- Villarroya-Beltri, C., Gutierrez-Vazquez, C., Sanchez-Cabo, F., Perez-Hernandez, D., Vazquez, J., Martin-Cofreces, N., Martinez-Herrera, D.J., Pascual-Montano, A., Mittelbrunn, M., Sanchez-Madrid, F., 2013.** Sumoylated hnRNP A2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat. Commun.* 4, 2980.
- Vivanco, I., Sawyers, C.L., 2002.** The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2, 489-501.
- Vlachos, I.S., Vergoulis, T., Paraskevopoulou, M.D., Lykokanellos, F., Georgakilas, G., Georgiou, P., Chatzopoulos, S., Karagkouni, D., Christodoulou, F., Dalamagas, T., Hatzigeorgiou, A.G., 2016.** DIANA-mirExTra v2.0: Uncovering microRNAs and transcription factors with crucial roles in NGS expression data. *Nucleic Acids Res.* 44, W128-W134.
- Wang, C., Gu, S., Cao, H., Li, Z., Xiang, Z., Hu, K., Han, X., 2016.** miR-877-3p targets Smad7 and is associated with myofibroblast differentiation and bleomycin-induced lung fibrosis. *Sci. Rep.* 6, 30122.

- Weill, N., Lisi, V., Scott, N., Dallaire, P., Pelloux, J., Major, F., 2015.** MiRBooking simulates the stoichiometric mode of action of microRNAs. *Nucleic Acids Res.* 43, 6730-6738.
- Weng, K.F., Hung, C.T., Hsieh, P.T., Li, M.L., Chen, G.W., Kung, Y.A., Huang, P.N., Kuo, R.L., Chen, L.L., Lin, J.Y., Wang, R.Y., Chen, S.J., Tang, P., Horng, J.T., Huang, H.I., Wang, J.R., Ojcius, D.M., Brewer, G., Shih, S.R., 2014.** A cytoplasmic RNA virus generates functional viral small RNAs and regulates viral IRES activity in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 42, 12789-12805.
- Werneke, S.W., Schilte, C., Rohatgi, A., Monte, K.J., Michault, A., Arenzana-Seisdedos, F., Vanlandingham, D.L., Higgs, S., Fontanet, A., Albert, M.L., Lenschow, D.J., 2011.** ISG15 is critical in the control of Chikungunya virus infection independent of UbE1L mediated conjugation. *PLoS Pathog.* 7, e1002322.
- Wilczynska, A., Bushell, M., 2015.** The complexity of miRNA-mediated repression. *Cell Death Differ.* 22, 22-33.
- Wilusz, J.E., Sunwoo, H., Spector, D.L., 2009.** Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world. *Genes Dev.* 23, 1494-1504.
- Wong, S.K., Li, W., Moore, M.J., Choe, H., Farzan, M., 2004.** A 193-amino acid fragment of the SARS coronavirus S protein efficiently binds angiotensin-converting enzyme 2. *J. Biol. Chem.* 279, 3197-3201.
- Woo, P.C., Lau, S.K., Chu, C.M., Chan, K.H., Tsoi, H.W., Huang, Y., Wong, B.H., Poon, R.W., Cai, J.J., Luk, W.K., Poon, L.L., Wong, S.S., Guan, Y., Peiris, J.S., Yuen, K.Y., 2005.** Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J. Virol.* 79, 884-895.
- Woo, P.C., Lau, S.K., Lam, C.S., Lau, C.C., Tsang, A.K., Lau, J.H., Bai, R., Teng, J.L., Tsang, C.C., Wang, M., Zheng, B.J., Chan, K.H., Yuen, K.Y., 2012.** Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. *J. Virol.* 86, 3995-4008.
- Wu, Z., Hao, R., Li, P., Zhang, X., Liu, N., Qiu, S., Wang, L., Wang, Y., Xue, W., Liu, K., Yang, G., Cui, J., Zhang, C., Song, H., 2013.** MicroRNA expression profile of mouse lung infected with 2009 pandemic H1N1 influenza virus. *PLoS One* 8, e74190.

- Yang, L., Aozasa, K., Oshimi, K., Takada, K., 2004.** Epstein-Barr virus (EBV)-encoded RNA promotes growth of EBV-infected T cells through interleukin-9 induction. *Cancer Res.* 64, 5332-5337.
- Ye, J., Zhang, B., Xu, J., Chang, Q., McNutt, M.A., Korteweg, C., Gong, E., Gu, J., 2007a.** Molecular Pathology in the Lungs of Severe Acute Respiratory Syndrome Patients. *Am. J. Pathol.* 170, 538-545.
- Ye, Y., Hauns, K., Langland, J.O., Jacobs, B.L., Hogue, B.G., 2007b.** Mouse hepatitis coronavirus A59 nucleocapsid protein is a type I interferon antagonist. *J. Virol.* 81, 2554-2563.
- Yoon, J.H., Abdelmohsen, K., Gorospe, M., 2014.** Functional interactions among microRNAs and long noncoding RNAs. *Semin. Cell Dev. Biol.* 34, 9-14.
- Yoshikawa, T., Hill, T.E., Yoshikawa, N., Popov, V.L., Galindo, C.L., Garner, H.R., Peters, C.J., Tseng, C.T., 2010.** Dynamic innate immune responses of human bronchial epithelial cells to severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infection. *PLoS One* 5, e8729.
- Zamore, P.D., Haley, B., 2005.** Ribo-gnome: the big world of small RNAs. *Science* 309, 1519-1524.
- Zarubin, T., Han, J., 2005.** Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res.* 15, 11-18.
- Zealy, R.W., Wrenn, S.P., Davila, S., Min, K.W., Yoon, J.H., 2017.** microRNA-binding proteins: specificity and function. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, e1414.
- Zhao, Z., Zhang, F., Xu, M., Huang, K., Zhong, W., Cai, W., Yin, Z., Huang, S., Deng, Z., Wei, M., Xiong, J., Hawkey, P.M., 2003.** Description and clinical treatment of an early outbreak of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangzhou, PR China. *J. Med. Microbiol.* 52, 715-720.
- Ziebuhr, J., 2005.** The coronavirus replicase, in: Enjuanes, L. (Ed.), *Coronavirus replication and reverse genetics*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp. 57-94.
- Ziebuhr, J., Snijder, E.J., Gorbalenya, A.E., 2000.** Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the *Nidovirales*. *J. Gen. Virol.* 81, 853-879.
- Zuñiga, S., Cruz, J.L., Sola, I., Mateos-Gomez, P.A., Palacio, L., Enjuanes, L., 2010.** Coronavirus nucleocapsid protein facilitates template switching and is required for efficient transcription. *J. Virol.* 84, 2169-2175.
- Zuñiga, S., Sola, I., Alonso, S., Enjuanes, L., 2004.** Sequence motifs involved in the regulation of discontinuous coronavirus subgenomic RNA synthesis. *J. Virol.* 78, 980-994.
- Zuñiga, S., Sola, I., Cruz, J.L., Enjuanes, L., 2009.** Role of RNA chaperones in virus replication. *Virus Res.* 139, 253-266.

- Zuñiga, S., Sola, I., Moreno, J.L., Sabella, P., Plana-Duran, J., Enjuanes, L., 2007.**  
Coronavirus nucleocapsid protein is an RNA chaperone. *Virology* 357, 215-227.